

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**



JC784 U.S. PTO
09/631863
08/03/00

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 36 563.6
Anmeldetag: 4. August 1999
Anmelder/Inhaber: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH, Ingelheim/DE
Bezeichnung: Tumorassoziertes Antigen
IPC: C 07 K, C 12 N, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 27. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

HolB



Case 12-211 DI Fa/dc

5

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

10 55216 Ingelheim am Rhein (D)

Titel: Tumorassoziiertes Antigen

Die Erfindung bezieht sich auf die Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

- 5 Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen zu schützen bzw. diese aktiv zu bekämpfen. Die Bedeutung eines intakten Immunsystems zeigt sich vor allem bei vererbten oder erworbenen Immundefizienzen. Der Einsatz
- 10 von prophylaktischen Vakzinprogrammen erwies sich in vielen Fällen als äußerst zielführende und erfolgreiche immunologische Intervention im Kampf gegen virale oder bakterielle Infektionserkrankungen. Weiters hat sich gezeigt, daß das Immunsystem auch an der Eliminierung
- 15 von Tumorzellen maßgeblich beteiligt ist. Dabei spielt die Erkennung der tumorassoziierten Antigene (TAAs) durch Komponenten des Immunsystems eine wesentliche Rolle. Im weitesten Sinn kann jede (peptidische oder nicht peptidische) Komponente einer Tumorzelle, die von
- 20 einem Element des Immunsystems erkannt und zur Stimulation einer immunologischen Antwort führt, als immunogenes Tumorantigen fungieren. Besondere Bedeutung kommt dabei jenen Tumorantigenen zu, die nicht nur eine immunologische Reaktion hervorrufen, sondern auch eine
- 25 Abstoßung des Tumors bewirken. Die Identifizierung definierter Antigene, die solch eine immunologische Reaktion bewirken können, stellt einen wichtigen Schritt für die Entwicklung einer molekular definierten Tumorstoffe dar. Obwohl noch nicht ganz geklärt ist,
- 30 welche Elemente des Immunsystems für eine Abstoßung des

Tumors verantwortlich sind, besteht doch ein Konsens darüber, daß dabei CD8-exprimierende zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) eine Hauptrolle spielen (Coulie, 1997). Besonders bei jenen Tumorarten (z.B. Melanom und Nierenkarzinom), die eine relativ hohe Spontanremissionsrate aufweisen, konnte eine Korrelation zwischen klinischem Verlauf und dem vermehrten Auftreten von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen festgestellt werden (Schendel et al., 1993; Mackensen et al., 1993; Halliday et al., 1995; Kawakami et al., 1995; Kawakami et al., 1996; Wang, 1997; Celluzzi und Falo, 1998). Dabei wurden spezifische CTL-Klone entweder aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) oder peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) nach Kokultivierung mit meist autologen Tumorzellen und Zytokinstimulierung *in vitro* erhalten. Sowohl in Tiermodellen als auch in *in vitro* kultivierten humanen Zellkultursystemen konnte die T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen durch Transfektion der Tumorzellen mit Zytokinen verstärkt werden (van Elsas et al., 1997; Gansbacher et al., 1990; Tepper et al., 1989; Fearon et al., 1990; Dranoff et al., 1993):

Aufgrund der Korrelation zwischen Remission und Beteiligung von CD8⁺-T-Zellen ist die Identifizierung tumorassoziierter Antigene (TAA), die durch CD8-positive CTLs erkannt werden, ein erklärtes Hauptziel auf dem Weg zur Entwicklung einer Tumorstimmung (Pardoll, 1998; Robbins und Kawakami, 1996). Ob auch andere Zelltypen des Immunsystems wie z.B. CD4⁺-T-Helferzellen eine wesentliche Rolle spielen ist noch unklar; einige Studien mit MAGE-3/HLA-A1 Peptiden in Melanompatienten deuten darauf hin

(Marchand et al., 1995; Boon et al., 1998). In den vergangenen Jahren ist eine Reihe von TAAs, die durch CTLs erkannt werden, identifiziert worden (Boon et al., 1994; van den Eynde und van der Bruggen, 1997).

- 5 T-Zellen erkennen Antigene als Peptidfragmente, die an Zelloberflächen von MHC-Molekülen („major histocompatibility complex“, im Menschen „HLA“ = „human leukocyte antigen“) präsentiert werden. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-I Moleküle kommen auf
- 10 den meisten Zellen mit Kern vor und präsentieren Peptide (üblicherweise 8-10-mere), die durch proteolytischen Abbau endogener Proteine entstehen (sog. Antigen-Verarbeitung, „antigen processing“). Peptid:MHC-I Komplexe werden von CD8-positiven CTLs
- 15 erkannt. MHC-II Moleküle kommen nur auf sog. „professionellen antigen-präsentierenden Zellen“ (APC) vor, und präsentieren Peptide exogener Proteine, die im Zuge der Endocytose von APC aufgenommen und verarbeitet werden. Peptid:MHC-II Komplexe werden von CD4-Helfer-T-
- 20 Zellen erkannt. Durch eine Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und Peptid:MHC Komplex können verschiedene Effektormechanismen ausgelöst werden, die im Fall von CTLs zur Apoptose der Zielzelle führen. Das geschieht, wenn entweder der MHC (z.B. im Fall der
- 25 Transplantatabstoßung), oder das Peptid (z.B. im Fall intrazellulärer Pathogene) als fremd erkannt wird. Allerdings erfüllen nicht alle präsentierten Peptide die strukturellen und funktionellen Anforderungen für eine effektive Interaktion mit T-Zellen (wie von
- 30 Rammensee et al., 1995 und weiter unten beschrieben).

Für den Einsatz von TAAs in einer Tumorstoffvakzine sind grundsätzlich mehrere Applikationsformen möglich: Das Antigen kann entweder als rekombinantes Protein mit geeigneten Adjuvantien bzw. Trägersystemen, oder als

5 für das Antigen kodierende cDNA in Plasmid- (DNA-Vakzine; Tighe et al., 1998), bzw. viralen Vektoren (Restifo, 1997) appliziert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von rekombinanten Bakterien (z.B. *Listeria*, *Salmonella*), die das humane

10 Antigen rekombinant exprimieren und durch ihre zusätzlichen Komponenten eine adjuvative Wirkung haben (Paterson, 1996; Pardoll, 1998). In allen diesen Fällen ist eine Verarbeitung und Präsentation des Antigens durch sog. „professionelle antigen-präsentierende

15 Zellen“ (APC) notwendig. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz synthetischer Peptide (Melief et al., 1996), die den korrespondierenden T-Zell-Epitopen des Antigens entsprechen und die entweder von außen auf die APC geladen (Buschle et al., 1997; Schmidt et al.,

20 1997) oder von den APC aufgenommen und intrazellulär auf die MHC I Moleküle transferiert werden. Die therapeutisch effizienteste Applikationsform für ein definiertes Antigen wird im allgemeinen in klinischen Studien bestimmt.

25 Zu den von den tumorspezifischen CTLs erkannten Antigenen bzw. deren Epitopen zählen Moleküle, die aus sämtlichen Proteinklassen stammen können (z.B. Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Enzyme; zur Übersicht siehe Rammensee et al., 1995; Robbins und

30 Kawakami, 1996). Diese Proteine müssen nicht notwendigerweise an der Zelloberfläche lokalisiert sein, wie dies bei der Erkennung durch Antikörper

erforderlich ist. Um für die Erkennung durch CTLs als tumorspezifisches Antigen zu fungieren bzw. um für die Therapie eingesetzt zu werden, müssen die Proteine bestimmte Bedingungen erfüllen: erstens soll das

5 Antigen hauptsächlich von Tumorzellen exprimiert werden und in sog. "kritischen" Normalgeweben nicht oder nur in geringerer Konzentration als in Tumoren vorkommen. Kritische Normalgewebe sind essentielle Gewebe; eine gegen sie gerichtete Immunreaktion könnte unter

10 Umständen schwerwiegende, zum Teil lethale Folgen haben. Zweitens soll das Antigen nicht nur im Primärtumor, sondern auch in den Metastasen vorhanden sein. Des weiteren ist es im Hinblick auf eine breite klinische Anwendung des Antigens erstrebenswert, wenn

15 es in mehreren Tumorarten in hoher Konzentration vorhanden ist. Eine weitere Vorbedingung für die Eignung eines TAA als wirksamer Bestandteil einer Vakzine ist das Vorhandensein von T-Zell-Epitopen in der Aminosäuresequenz des Antigens; vom TAA abgeleitete

20 Peptide sollen zu einer *in vitro/in vivo* T-Zell Antwort führen ("immunogenes" Peptid). Ein weiteres Selektionskriterium für ein klinisch breit anwendbares immunogenes Peptid ist die Häufigkeit, mit der das Antigen in einer gegebenen Patientenpopulation

25 anzutreffen ist.

Die immunogenen tumorassoziierten Antigene (TAAs), von denen größtenteils bereits gezeigt wurde, daß sie T-Zell Epitope besitzen, lassen sich in mehrere Kategorien einteilen, u.a. virale Proteine, mutierte

30 Proteine, überexprimierte Proteine, durch chromosomale Translokation gebildete Fusionsproteine, Differenzierungsantigene, onkofötale Antigene (Van den

Eynde und Brichard, 1995; van den Eynde und van der Bruggen, 1997).

Die Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von TAAs, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Tumorstoffe darstellen, beruhen einerseits auf dem Einsatz von in Patienten bereits induzierten CTLs (zelluläre Immunantwort) oder Antikörpern (humorale Immunantwort), oder basieren auf der Erstellung differenzieller Transkriptionsprofile zwischen Tumoren und Normalgeweben. Im ersten Fall, dem immunologischen Ansatz, werden Patienten-CTLs für ein Screening eukaryotischer Tumor-cDNA-Expressionsbibliotheken, die über MHC-I Moleküle die CTL-Epitope präsentieren, eingesetzt (Boon et al., 1994), während mittels hochaffiner Patienten-Antisera prokaryotische-cDNA-Expressionsbibliotheken, direkt über eine Immunoblot-Analyse der einzelnen Plaques auf das Vorhandensein von TAAs untersucht werden (Sahin et al., 1995). Eine Kombination von CTL-Reaktivität und proteinchemischen Verfahren stellt die Isolierung von aus MHC-I isolierten Peptiden von Tumorzellen dar, die über Reaktivität mit Patienten-CTLs vorselektioniert wurden. Die Peptide werden aus dem MHC-I Komplex ausgewaschen und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert (Falk et al., 1991; Woelfel et al., 1994; Cox et al., 1994). Die Ansätze, welche CTLs zum Charakterisieren von Antigenen verwenden, sind aufgrund der erforderlichen Kultivierung und Aktivierung von CTLs mit einem erheblichen Aufwand verbunden bzw. nicht immer erfolgreich.

Methoden zur Identifizierung von TAAs, welche auf dem Vergleich des Transkriptionsprofils von Normal- mit Tumorgewebe beruhen, sind vielfältig; dazu zählen die differenzielle Hybridisierung, die Erstellung von

5 Subtraktions-cDNA-Banken ("representational difference analysis"; Hubank und Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) und der Einsatz der DNA-Chip Technologie oder der SAGE-Methode (Velculescu et al., 1995). Im Gegensatz zur oben erwähnten immunologischen Methode mit Hilfe

10 von Patienten-CTLs muß beim Einsatz von molekularbiologischen Methoden gezeigt werden, daß die damit gefundenen potentiellen Antigenkandidaten tumorspezifisch (tumorassoziiert) sind und tatsächlich T-Zell Epitope besitzen, die eine zytotoxische T-Zell

15 Antwort auslösen können. In zumindest einem Fall (NY-ESO/LAGE-1) wurde ein Antigen sowohl durch die Verwendung von Patientenseren als auch durch RDA identifiziert (Chen et al., 1997; Lethe et al. 1998), außerdem wurden CTL-Epitope dieses Antigens und eine

20 gleichzeitige spontane humorale und T-Zell Antwort in einem Patienten beschrieben (Jager et al., 1998).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein neues tumorassoziiertes Antigen (TAA) bereitzustellen.

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem zunächst mittels RDA

25 („representational difference analysis“) zwischen einer von einem Pankreas Carcinom Patienten abgeleiteten Zelllinie und einem Pool von 11 verschiedenen Normalgeweben eine cDNA-Subtraktionsbibliothek hergestellt wurde. Zur Generierung der für die

30 subtraktive Hybridisierung notwendigen cDNA-Fragmente von „tester“ und „driver“ wurde in Abweichung vom

ursprünglichen Protokoll (Diatchenko et al., 1996) eine Mischung von 6 verschiedenen Restriktionsenzymen eingesetzt. Die Verwendung einer Mischung verschiedener Restriktionsenzyme, die 6 Basenpaare als

5 Erkennungssequenz benötigen, hat gegenüber dem ursprünglichen Protokoll (Diatchenko et al., 1996) folgende Vorteile: a) durch Auswahl von jeweils zwei Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenzen durch 6-er Kombination der Basen A/T (z.B. Ssp I: AATATT) oder

10 C/G (z.B. Nae I: GCCGGC) oder A/C/G/T (z.B. EcoR V: GATATC) dargestellt sind, werden sowohl GC- als auch AT-reiche Regionen eines Gens gleichermaßen geschnitten, wodurch eine homogene Repräsentanz der gesamten Genregion als Restriktionsfragmente ermöglicht

15 wird; b) weiters ist es dadurch möglich, im statistischen Mittel größere cDNA-Fragmente des Kandidatengens zu erhalten (ca. 800 bp), was wiederum bei der nachfolgenden Analyse (Sequenzierung und Annotation) und der Klonierung der „full-size“ cDNA von

20 großem Vorteil ist. Im Originalprotokoll (Diatchenko et al., 1996) wurde ein nur 4-Basen erkennendes Restriktionsenzym (Rsa I) eingesetzt, das zu einer mittleren Fragmentlänge von 256 bp führt und spezifisch CG- oder AT-reiche Regionen nicht prozessieren kann. Um

25 der durch die längeren Insert-cDNA-Fragmente veränderten Hybridisierungskinetik gerecht zu werden, wurde das PCR-Protokoll, wie im Beispiel 2, beschrieben geändert.

Zur Selektion der im Tumor überexprimierten Antigene

30 wurden zunächst die erhaltenen cDNA-Klone vereinzelt und davon jeweils eine Glycerinstammkultur, eine Plasmidpräparation und eine das Insert darstellende

Sammlung der PCR-Fragmente im 96-Loch-Plattenformat etabliert. Zunächst wurden 50 zufällig ausgewählte cDNA-Fragmente der 3450 Klone der subtraktiven cDNA-Bibliothek des Pankreas Karzinoms zur Selektion der im Tumor überexprimierten Antigene sequenziert und mit in Datenbanken verfügbaren Sequenzen verglichen. Unter den dabei annotierten Genen befanden sich 12 unbekannte, zu denen ESTs („expressed sequence tags“)-Einträge in der Datenbank existierten. Ein Klon, R11, wies durch seine bevorzugte Präsenz in fötalen Geweben ein im Hinblick auf einen möglichen Einsatz als TAA geeignetes EST-Profil auf. Weitere Untersuchungen mittels semi-quantitativer RT-PCR und Northern Blot Analyse bestätigten die bevorzugte Expression in verschiedenen Tumor- (Mamma-, Nierenzell- und Pankreaskarzinom) sowie immunprivilegierten Geweben (Testis, Plazenta und Nebenniere) und keine oder eine geringe Expression in Normalgeweben. Weiters ist aus den durch Northern Blot Experimente gewonnenen Daten zu schließen, daß das R11-Transkript eine Länge von ca. 7,5 kb hat und möglicherweise in der Nebenniere Splicevarianten oder homologe Gene existieren.

Die humane R11-cDNA wurde aus Testis kloniert, die erhaltene Sequenz ist in SEQ ID NO:1 dargestellt. Die Sequenz von R11 zeigt sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene keine Identität oder Homologie zu einem bekannten Gen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung erhaltene R11-cDNA weist einen für 356 Aminosäuren kodierenden durchgehenden Leserahmen auf, von dem aufgrund der erhaltenen Ergebnisse anzunehmen ist, daß er den C-terminalen Abschnitt des vollständigen R11-Antigens repräsentiert. Die im Zuge

der vorliegenden Erfindung klonierte R11-cDNA weist eine Länge von 5714 bp auf, wobei das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes am 3'-Ende der Sequenz für die Vollständigkeit der cDNA in diesem Bereich spricht.

- 5 Aufgrund der im Rahmen vorliegenden Erfindung erhaltenen Daten kann nicht ausgeschlossen werden, daß 5' von der sequenzierten cDNA ein weiteres ATG vorliegt, das das Start-ATG darstellt; in diesem Fall kodiert die vorliegende cDNA für den C-terminalen
- 10 Abschnitt von R11. Informationen über das 5'-Ende und eine gegebenenfalls weiter stromaufwärts liegende kodierende DNA-Sequenz können durch molekularbiologische Standardmethoden gewonnen werden, z.B. mittels 5'-RACE („rapid amplification of cDNA
- 15 ends“). Bei dieser Methode wird RNA, vorzugsweise mRNA, aus Zellen oder Geweben, in denen R11 transkribiert wird (z.B. Mamma-, Nierenzell- oder Pankreaskarzinomgewebe) revers transkribiert und anschließend mit einem Adaptor bekannter Sequenz
- 20 ligiert. Eine PCR mit einem Adaptorprimer (bindet spezifisch an den Adaptor am 5'-Ende der cDNA) und einem R11-spezifischen Primer (z.B. SEQ ID NO: 25) erlaubt die Amplifikation entsprechender R11-Fragmente. Diese PCR-Produkte können, wie in Beispiel 6
- 25 beschrieben, nach Standardmethoden kloniert und, insbesondere durch DNA Sequenzierung, charakterisiert werden.

Eine alternative Methode zur Charakterisierung des 5'-Endes ist das Screenen von cDNA-Bibliotheken durch

30 Hybridisierung mit für R11 spezifischen DNA-Sonden oder

die Analyse von cDNA-Expressions Bibliotheken mit Antiseren.

- Führt das Screenen von cDNA-Bibliotheken aufgrund methodisch bedingter Beschränkungen, z.B. ineffiziente reverse Transkription, bedingt durch ausgeprägte Sekundärstrukturen der RNA, nicht zum gewünschten Ziel, können genomische Bibliotheken untersucht werden, indem z.B., wie beim Screenen von cDNA-Bibliotheken, durch Hybridisierung mit für R11 spezifischen DNA-Sonden Klone isoliert werden können, die die stromaufwärts vom erhaltenen 5'-Ende der cDNA liegende Sequenzinformation z.B. die Promotorregion von R11 enthalten.

- Im Zuge der vollständigen Klonierung der R11-cDNA kann festgestellt werden, ob der im Bereich des vorliegenden cDNA-Abschnitts erhaltene offene Leserahmen eine Fortsetzung im 5'-Bereich aufweist und/oder ob alternative Leserahmen vorliegen.

- Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung isolierte cDNA weist die in SEQ ID NO:1 angegebene Nukleotidsequenz auf; es ist anzunehmen (vgl. oben), daß sie für den C-terminalen Abschnitt des tumorassoziierten Antigens (TAA) der Bezeichnung R11 kodiert.

Ein von der isolierten cDNA exprimiertes Protein weist die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz auf.

- Die Erfindung betrifft somit in einem ersten Aspekt ein tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung R11, das die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz aufweist.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung R11, das die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz als Teilsequenz enthält (dies trifft
5 für den Fall zu, daß in 5'-Richtung eine Verlängerung des vorliegenden offenen Leserahmens vorliegt).

Bei dem Protein mit der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Sequenz handelt es sich um ein Produkt, das von einem ca. 7,5 kb großen Transkripts translatiert ist, bzw.
10 das von den Transkripten einer Größe von ca. 3,8 kb und 2,3 kb translatiert ist, das von Spleißvarianten des 7,5 kb Transkripts, wie sie im Gewebe der Nebenniere anzutreffen sind oder von Transkripten der dazu homologen Gene abgeleitet sind.

15 Die in SEQ ID NO: 2 dargestellte Aminosäuresequenz kann Abweichungen aufweisen, z.B. solche, die durch Austausch von Aminosäuren bedingt sind, sofern das R11-Derivat die für die Anwendung in einer Tumorstoffimpfung erwünschten immunogenen Eigenschaften aufweist.

20 Die natürliche Aminosäuresequenz von R11 kann gegebenenfalls modifiziert sein, indem einzelne Aminosäuren in einem R11 CTL-Epitop ausgetauscht werden, um, im Vergleich zum natürlichen R11 CTL-Epitop, eine Steigerung der Affinität von R11-Peptiden
25 zu MHC-I-Molekülen und damit eine erhöhte Immunogenität und letztlich eine verstärkte Reaktivität gegenüber Tumoren zu bewirken. Modifikationen im Bereich der R11-Epitope können am R11-Gesamtprotein (dieses wird von den APCs zu den entsprechenden Peptiden

prozessiert) bzw. an größeren R11-Proteinfragmenten oder an R11-Peptiden (vgl. unten) vorgenommen werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung immunogene Fragmente und Peptide, die von R11
5 abgeleitet sind. Letztere werden im folgenden als "R11-Peptide" bezeichnet. Eine erste Gruppe sind R11-Peptide, die eine humorale Immunantwort (Induktion von Antikörpern) auslösen. Derartige Peptide sind
10 ausgewählte Abschnitte von R11 (mindestens 12 bis 15 Aminosäuren), die mittels sogenannter Vorhersage-Algorithmen ("prediction algorithms") wie z.B. dem "surface probability blot" (Emini et al., 1985), dem "hydrophobicity blot" (Kyte and Doolittle, 1982) und dem "antigenic index" (Jameson and Wolf, 1988) ermittelt
15 werden können.

Miteingeschlossen sind auch all jene Peptide, die aus dem gegebenenfalls im Zuge der weiteren Klonierung erhaltenen N-terminalen Bereich von R11 abgeleitet sind.

Es ist bekannt, daß tumorassoziierte Antigene
20 tumorspezifische Mutationen aufweisen können, die zu einer immunologischen Unterscheidung zwischen Tumor und Normalgewebe beitragen (Mandruzzato et al., 1997; Hogan et al., 1998; Gaudi et al., 1999; Wölfel et al., 1995). Um das Vorhandensein tumorspezifischer R11-Mutationen
25 festzustellen, wird, zweckmäßig mit Hilfe von Sonden aus der erfindungsgemäßen, aus Testis isolierten cDNA, die R11-cDNA aus einem oder mehreren unterschiedlichen Tumoren kloniert und die erhaltenen Sequenzen mit Normalgewebs-R11-cDNA verglichen. Es ist zu erwarten,
30 daß Tumor-R11-Peptide aus einem gegenüber Normalgewebs-

R11 mutierten Sequenzabschnitt im Vergleich zu Normalgewebs-R11-Peptiden aus dem entsprechenden Abschnitt eine verstärkte Immunogenität aufweisen. Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren
5 Aspekt R11-Peptide, abgeleitet von Bereichen eines tumorexprimierten R11, die tumorspezifische Mutationen aufweisen.

Bei der therapeutischen Anwendung werden R11-Peptide direkt oder in modifizierter Form (z.B. an KLH =
10 "keyhole limpet hemocyanine" gekoppelt) verabreicht und die Bildung von Antikörpern mittels gängiger immunologischer Assays, z.B. mittels ELISA, bestimmt.

Weitere, im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugte, R11-Peptide sind diejenigen, die durch
15 MHC-Moleküle präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort bewirken. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, nämlich MHC-I-Moleküle, die von CD8-positiven CTLs und MHC-II-Moleküle, die von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt werden.

20 Damit ein Peptid eine zelluläre Immunantwort auslöst, muß es an ein MHC-Molekül binden, wobei der zu behandelnde Patient das MHC-Molekül in seinem Repertoire aufweisen muß. Die Bestimmung des MHC-Subtyps des Patienten stellt somit, im Hinblick auf die Auslösung
25 einer zellulären Immunantwort, eine der wesentlichen Voraussetzungen für die wirksame Anwendung eines Peptids an diesem Patienten dar.

Die Sequenz eines therapeutisch einzusetzenden R11-Peptids wird durch das jeweilige MHC-Molekül
30 hinsichtlich Ankeraminosäuren und Länge vorgegeben.

Definierte Ankerpositionen und Länge gewährleisten, daß ein Peptid in die Peptid-Bindungsfurche des jeweiligen MHC-Moleküls des Patienten paßt. Dies hat zur Folge, daß das Immunsystem stimuliert wird und eine zelluläre Immunreaktion erzeugt wird, die sich, im Falle der Verwendung eines von einem Tumorantigen abgeleiteten Peptids, gegen die Tumorzellen des Patienten richtet.

Immunogene RII-Peptide können nach bekannten Methoden identifiziert werden, eine der Grundlagen dafür ist die Beziehung zwischen MHC-Bindung und CTL-Induktion.

Da also die Sequenz immunogener Peptide aufgrund ihres Peptidbindungsmotivs vorherbestimmbar ist, können RII-Peptide, die CTL-Epitope darstellen, aufgrund der RII-Proteinsequenz identifiziert und synthetisiert werden. Dazu sind verschiedene Methoden geeignet, die zur Identifizierung von CTL-Epitopen von bekannten Protein-Antigenen verwendet wurden; z.B. die von Stauss et al., 1992, für die Identifizierung von T-Zell-Epitopen in humanem Papillomavirus beschriebene Methode.

Die allelspezifischen Anforderungen jedes MHC-I Allel-Produkts an ein Peptid, das an das MHC-Molekül bindet und von diesem präsentiert wird, wurden als Motiv zusammengefaßt (z.B. Falk et al., 1991). Bisher ist eine große Anzahl sowohl von MHC-Peptid-Motiven als auch von MHC-Liganden bekannt. Eine im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Suche nach Epitopen eines bekannten Proteins, das in ein bestimmtes MHC-I-Molekül paßt, wurde in einem Übersichtsartikel von Rammensee et al., 1995,

beschrieben. Sie umfaßt die folgenden Schritte:

zunächst wird die Protein-Sequenz auf Abschnitte untersucht, die dem Anker-Motiv entsprechen, wobei gewisse Variationen hinsichtlich Peptidlänge und

- 5 Ankerbesetzung möglich sind. Wenn z.B. ein Motiv ein 9-mer mit Ile oder Leu am Ende vorschreibt, können auch 10-mere mit einem entsprechenden C-Terminus in Betracht gezogen werden, ebenso Peptide mit anderen aliphatischen Resten, wie Val oder Met am C-Terminus.

- 10 Auf diese Weise wird eine Reihe von Peptid-Kandidaten erhalten. Diese werden auf das Vorhandensein möglichst vieler Ankerreste, die sie gemeinsam mit bereits bekannten Liganden haben, untersucht und/oder daraufhin, ob sie für verschiedene MHC-Moleküle

- 15 "bevorzugte" Reste haben (entsprechend der Tabelle von Rammensee et al., 1995). Um schwach bindende Peptide auszuschließen, werden zweckmäßig Bindungs-Assays durchgeführt. Wenn die Anforderungen an die Peptid-Bindung für bestimmte MHC-Moleküle bekannt sind, können

- 20 die Peptid-Kandidaten auch auf Nicht-Ankerreste untersucht werden, die sich negativ oder positiv auf die Bindung auswirken, oder die diese erst ermöglichen (Ruppert et al., 1993). Bei dieser Vorgangsweise ist jedoch in Betracht zu ziehen, daß das Peptid-Bindungs-

- 25 Motiv für die Suche nach natürlichen Liganden nicht allein ausschlaggebend ist; auch andere Aspekte, z.B. die Enzymspezifität während der Antigenprozessierung, tragen - zusätzlich zur Spezifität der MHC-Bindung - zur Identität des Liganden bei. Eine Methode, die diese
30 Aspekte berücksichtigt, und die im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Identifizierung von immunogenen R11-Peptiden geeignet ist, wurde u.a. von

Kawakami et al., 1995, angewendet, um auf der Grundlage bekannter HLA-A*0201 Motive gp100 Epitope zu identifizieren.

Die Peptide können auch im Hinblick auf ihre
5 Bindungsfähigkeit an MHC-II-Moleküle ausgewählt werden.
Das MHC-II-Bindungsmotiv, das sich über neun
Aminosäuren erstreckt, weist einen höheren Grad an
Degeneration in den Ankerpositionen auf als das MHC-I-
Bindungsmotiv. Es wurden kürzlich, ausgehend von der
10 Röntgenstrukturanalyse von MHC-II-Molekülen, Methoden
entwickelt, die die genaue Analyse der MHC-II-
Bindungsmotive, und ausgehend davon, Variationen der
Peptidsequenz erlauben (Rammensee et al., 1995 und die
dort zitierte Originalliteratur). Peptide, die an
15 MHC-II-Moleküle binden, werden den CD4-T-Zellen
typischerweise von dendritischen Zellen, Makrophagen
oder B-Zellen präsentiert. Die CD4-T-Zellen wiederum
aktivieren dann in der Folge direkt CTLs durch z.B.
Cytokin-Ausschüttung und Verstärken die Effizienz der
20 Antigen-Präsentation durch APC (dendritische Zellen,
Makrophagen und B-Zellen).

Seit kurzem sind Datenbanken und Vorhersage-Algorithmen
verfügbar, die mit großer Verlässlichkeit die Vorhersage
von Peptid-Epitopen erlauben, die an ein bestimmtes
25 MHC-Molekül binden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden, unter
Verwendung des von Parker et al., 1994 und Rammensee et
al., 1995 beschriebenen Algorithmus, für die
wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1,
30 -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, Kandidaten-Peptide

des C-terminalen Fragments von R11 identifiziert, von denen zu erwarten ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die ermittelten Peptide sind in Tabelle 1
5 aufgelistet. Auf ähnliche Weise können, gegebenenfalls unter Verwendung weiterer Algorithmen, die den unterschiedlichen Charakteristika der Peptide (Hydrophobizität, Ladung, Größe) bzw. Anforderungen an die Peptide, z.B. die 3D-Struktur des HLA-Moleküls,
10 Rechnung tragen, weitere potentielle Peptid-Epitope ermittelt werden; dies gilt auch für Peptid-Epitope anderer HLA-Typen.

Nach Auswahl von R11-Peptid-Kandidaten mit Hilfe der angeführten Methoden wird deren MHC-Bindung mittels
15 Peptidbindungs-Assays getestet. Als nächstes wird die Immunogenität der Peptide mit guten Bindungseigenschaften bestimmt (Stabilität der Peptid-MHC-Wechselwirkung korreliert in den meisten Fällen mit Immunogenität; van der Burg et al., 1996). Um die
20 Immunogenität des ausgewählten Peptids oder Peptid-Äquivalents zu bestimmen, können Methoden, wie z.B. von Sette et al., 1994, beschrieben, in Kombination mit quantitativen MHC-Bindungs-Assays verwendet werden. Alternativ kann die Immunogenität des ausgewählten
25 Peptids über *in vitro* CTL-Induktion mittels bekannter Methoden (wie weiter unten für *ex vivo* CTL-Induktion beschrieben) getestet werden. Das Prinzip der in mehreren Schritten durchgeführten Methode für die Auswahl von Peptiden, die zur Auslösung einer
30 zellulären Immunantwort fähig sind, ist in der WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, beschrieben. Eine allgemeine

Strategie zum Erhalt effizienter immunogener Peptide, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet ist, wurde außerdem von Schweighoffer, 1997, beschrieben.

5 Statt die Originalpeptide zu verwenden, die in die Bindungsfurche von MHC-I -oder MHC-II-Molekülen passen, also Peptide, die unverändert von R11 abgeleitet sind, können anhand der auf der Grundlage der Originalpeptidsequenz angegebenen Minimalanforderungen bezüglich Ankerpositionen und Länge Variationen
10 vorgenommen werden, sofern durch diese Variationen die effektive Immunogenität des Peptids, die sich zusammensetzt aus seiner Bindungsaffinität an das MHC-Molekül und seiner Fähigkeit, T-Zell-Rezeptoren zu stimulieren, nicht nur nicht beeinträchtigt ist,
15 sondern vorzugsweise verstärkt wird. In diesem Fall werden also künstliche Peptide oder Peptid-Äquivalente verwendet, die entsprechend den Anforderungen der Bindungsfähigkeit an ein MHC-Molekül entworfen sind.

Solchermaßen veränderte Peptide werden als
20 „heteroclitische Peptide“ bezeichnet. Sie können nach folgenden Methoden erhalten werden:

Zunächst werden die Epitope von MHC-I- bzw. MHC-II-Liganden bzw. deren Variation z.B. nach dem von Rammensee et al., 1995, beschriebenen Prinzip
25 vorgenommen. Die Länge des Peptids entspricht im Falle seiner Abstimmung auf MHC-I Moleküle vorzugsweise einer Minimalsequenz von 8 bis 10 Aminosäuren mit den erforderlichen Ankeraminosäuren.

Gegebenenfalls kann das Peptid auch am C- und/oder am
30 N-Terminus verlängert sein, sofern diese Verlängerung

die Bindungsfähigkeit an das MHC-Molekül nicht beeinträchtigt bzw. das verlängerte Peptid auf die Minimalsequenz zellulär prozessiert werden kann.

- Die modifizierten Peptide werden daraufhin auf ihre
- 5 Erkennung durch TILs („tumor-infiltrating lymphocytes“), auf CTL-Induktion sowie auf verstärkte MHC-Bindung und Immunogenität geprüft, wie von Parkhurst et al., 1996, und Becker et al., 1997, beschrieben.
- 10 Eine weitere im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Auffindung von Peptiden mit stärkerer Immunogenität als die der natürlichen R11-Peptide besteht im Screenen von Peptid-Bibliotheken mit CTLs, die die natürlich auf Tumoren vorkommenden
- 15 R11-Peptide erkennen, wie von Blake et al., 1996, beschrieben; in diesem Zusammenhang wird die Verwendung kombinatorischer Peptid-Bibliotheken vorgeschlagen, um Moleküle zu entwerfen, welche von MHC-I-restringierten CTLs erkannte Tumorepitope nachahmen.
- 20 Das R11-Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder davon abgeleitete immunogene Fragmente oder Peptide können rekombinant oder mittels Peptid-Synthese hergestellt werden, wie in der WO 96/10413 beschrieben, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Für
- 25 die rekombinante Herstellung wird das entsprechende DNA-Molekül nach Standardmethoden in einen Expressionsvektor eingefügt, in eine geeignete Wirtszelle transfiziert, der Wirt unter geeigneten Expressionsbedingungen kultiviert und das Protein
- 30 gereinigt. Für die chemische Synthese von R11-Peptiden

können herkömmliche Methoden verwendet werden, z.B. im Handel erhältliche automatische Peptid-Synthesizer.

- Alternativ zu natürlichen R11-Peptiden oder heteroclitischen Peptiden können Substanzen, die solche Peptide vortäuschen, z.B. "Peptidomimetica" oder "retro-inverse-Peptide", verwendet werden. Zur Testung dieser Moleküle im Hinblick auf die therapeutische Verwendbarkeit in einer Tumorstoffimpfung werden dieselben Methoden angewendet wie oben für die natürlichen R11-Peptide oder R11-Peptidäquivalente.

- Das TAA der Bezeichnung R11 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z.B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von R11-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Mamma-, Nierenzell- und Pankreaskarzinom.

- Die Immunantwort in Form einer Induktion von CTLs kann *in vivo* oder *ex vivo* bewirkt werden.

- Für die *in vivo* Induktion von CTLs wird eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend als wirksame Komponente das TAA R11 bzw. davon abgeleitete Fragmente oder Peptid(e), einem Patienten verabreicht, der an einer mit dem TAA assoziierten Tumorerkrankung leidet, wobei die Menge an TAA(Peptid) ausreichen muß, um eine wirksame CTL-Antwort auf den Antigen-tragenden Tumor zu erzielen.

Die Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt eine pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, topische, orale oder lokale Verabreichung. Vorzugsweise dient die Zusammensetzung der parenteralen

5 Verabreichung, z.B. für die subkutane, intradermale oder intramuskuläre Anwendung. Die R11-TAA/Peptide sind in einem pharmazeutisch annehmbaren, vorzugsweise wässrigen, Träger gelöst oder suspendiert. Die Zusammensetzung kann außerdem übliche Hilfsstoffe, wie

10 Puffer, etc. enthalten. Die R11-TAA/Peptide können allein oder in Kombination mit Adjuvantien, z.B. inkomplettem Freund's Adjuvans, Saponinen, Aluminiumsalzen oder, in einer bevorzugten Ausführungsform, Polykationen wie Polyarginin oder

15 Polylysin, verwendet werden. Die Peptide können auch an Komponenten, die die CTL-Induktion oder CTL-Aktivierung unterstützen, gebunden werden, z.B. an T-Helferpeptide, Lipide oder Liposomen, oder sie werden gemeinsam mit diesen Substanzen und/oder gemeinsam mit

20 immunstimulierenden Substanzen, z.B. Zytokinen (IL-2, IFN- γ) verabreicht. Methoden und Formulierungen, die zur Herstellung und Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet sind, sind in der WO 95/04542 und WO 97/30721, auf deren Offenbarung

25 hiermit Bezug genommen wird, beschrieben.

R11-Fragmente bzw. R11-Peptide können auch verwendet werden, um eine CTL-Antwort ex vivo auszulösen. Eine ex vivo CTL-Antwort auf einen Tumor, der R11 exprimiert, wird induziert, indem man die CTL-Vorläuferzellen

30 zusammen mit APCs und R11-Peptiden bzw R11-Protein inkubiert. Dann läßt man die aktivierten CTLs expandieren, worauf sie dem Patienten wieder verabreicht

werden. Alternativ können APCs mit R11-Peptiden beladen werden, was zu einer effizienten Aktivierung zellulärer Immunreaktionen gegen R11 positive Tumoren führen kann (Mayordomo et al., 1995; Zitvogel et al., 1996). Eine
5 geeignete Methode um Peptide auf Zellen, z.B. dendritische Zellen, zu laden, wird in der WO 97/19169 geoffenbart.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine Kombination mehrerer verschiedener R11-Peptide oder
10 R11-Peptidäquivalente angewendet. In einer weiteren Ausführungsform werden R11-Peptide mit von anderen TAAs abgeleiteten Peptiden kombiniert. Die Auswahl von Peptiden für derartige Kombinationen wird im Hinblick auf die Erfassung unterschiedlicher MHC-Typen getroffen,
15 um eine möglichst breite Patientenpopulation abzudecken, und/oder sie wird auf ein möglichst breites Indikationsspektrum abgestellt, indem Peptide mehrerer unterschiedlicher Tumorantigene kombiniert werden. Die Anzahl der Peptide in einer pharmazeutischen
20 Zusammensetzung kann über einen weiten Bereich schwanken, typischerweise enthält eine klinisch anwendbare Vakzine 1 bis 15, vorzugsweise 3 bis 10 verschiedene Peptide.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch als
25 diagnostische Reagentien eingesetzt werden. Beispielsweise können die Peptide dazu benutzt werden, um das Ansprechen eines Patienten auf die durch das immunogene Peptid hervorgerufene humorale oder zelluläre Immunantwort zu testen. Dadurch besteht die Möglichkeit,
30 ein Behandlungsprotokoll zu verbessern. Beispielsweise kann in Abhängigkeit der Darreichungsform (Peptid,

- Gesamtprotein oder DNA-Vakzine) des TAA die Zunahme von Vorläufer T-Zellen in den PBLs, die eine Reaktivität gegen das definierte Peptidepitop aufweisen, untersucht werden (Robbins und Kawakami, 1996 sowie darin zitierte
- 5 Referenzen). Außerdem können die Peptide oder das Gesamtprotein bzw. gegen das TAA gerichtete Antikörper dazu verwendet werden, um den Krankheitsverlauf eines R11-positiven Tumors zu charakterisieren (z.B. durch immunhistochemische Analysen von Primärtumor und
- 10 Metastasen). Eine derartige Strategie hat sich schon mehrfach als erfolgreich erwiesen, z.B. der Nachweis des Östrogenrezeptors als Entscheidungsgrundlage zur Endokrintherapie bei Brustkrebs; c-erbB-2 als relevanter Marker bei Prognostik und Therapieverlauf bei Brustkrebs
- 15 (Ravaioli et al., 1998; Revillion et al., 1998); PSMA ("prostate specific membrane antigen") als Marker für Epithelialzellen des Prostatakarzinoms im Serum bzw. durch Einsatz eines ¹¹¹In-markierten monoklonalen Antikörpers gegen PSMA bei der Immunoscintigraphie auf
- 20 Prostatakarzinom (Murphy et al., 1998 und inkludierte Referenzen); CEA ("carcinoembryonic antigen") als serologischer Marker für die Prognose und Verlauf bei Patienten des kolorektalen Karzinoms (Jessup und Loda, 1998).
- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt isolierte DNA-Moleküle, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften von R11 oder für Fragmente davon.

- In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende
- 30 Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül, das die in SEQ ID NO:1 dargestellte Nukleotidsequenz aufweist bzw.

ein Polynukleotid, das mit diesem DNA-Molekül unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Unter „stringenten Bedingungen“ wird z.B. verstanden:

Inkubation über Nacht bei 65°C - 68°C mit 6xSSC (1x

5 SSC = 150 mM NaCl, 15mM Tri-Natriumcitrat),

5xDenhardt's Lösung, 0.2%SDS, 50µg/ml Lachsspermien-DNA, daran anschließend Waschen zweimal 30 min mit

2xSSC, 0.1% SDS bei 65°C, einmal 30 min mit 0.2xSSC,

0.1% SDS bei 65°C und gegebenenfalls abschließendes

10 Spülen mit 0.1xSSC, 0.1%SDS bei 65°C.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende

Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül, das ein

Polynukleotid der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz als Teilsequenz enthält oder das ein Polynukleotid

15 enthält, das mit einem Polynukleotid dieser Sequenz

unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle bzw. Fragmente davon

kodieren für (Poly)peptide der Bezeichnung R11,

bestehend aus oder enthaltend die in SEQ ID NO: 2

20 dargestellte Aminosäuresequenz, bzw. für davon

abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide; damit sind

DNA-Moleküle mitumfaßt, die durch die Degeneration des

genetischen Codes Abweichungen von der in SEQ ID NO: 1

dargestellten Sequenz aufweisen.

25 Die Erfindung betrifft auch DNA-Moleküle, die durch

Mutation zu einem Austausch von Aminosäuren in der in

SEQ ID NO: 2 dargestellten Proteinsequenz führen,

sofern sie für ein R11-Derivat bzw. Fragmente oder

Peptide mit den für die Anwendung als Tumorstoffe
erwünschten immunogenen Eigenschaften kodieren.

Die R11-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung oder
die entsprechenden RNAs, die ebenfalls Gegenstand der
5 vorliegenden Erfindung sind, werden, wie die davon
kodierte (Poly)Peptide, für die Immuntherapie von
Krebserkrankungen eingesetzt.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden
DNA-Moleküle, kodierend für natürliche R11-Polypeptide
10 verwendet. Alternativ zur natürlichen R11-cDNA bzw.
Fragmenten davon können modifizierte Derivate verwendet
werden. Diese umfassen Sequenzen mit Modifikationen,
die für ein Protein(fragment) bzw. Peptide mit
stärkerer Immunogenität kodieren, wobei für die
15 Modifikationen auf DNA-Ebene dieselben Überlegungen
gelten wie für die oben beschriebenen Peptide. Eine
weitere Art der Modifikation ist die Aneinanderreihung
zahlreicher Sequenzen, kodierend für immunologisch
relevante Peptide, nach Art einer Perlenschnur
20 ("string-of-beads"; Toes et al., 1997). Die Sequenzen
können auch durch Anfügung von Hilfselementen
modifiziert werden, z.B. Funktionen, die eine
effizientere Abgabe und Prozessierung des Immunogens
gewährleisten (Wu et al., 1995). Beispielsweise kann
25 durch Anfügen einer Lokalisierungssequenz in das
endoplasmatische Retikulum ("ER targeting sequence")
die Prozessierung und damit die Präsentation und
schließlich die Immunogenität des Antigens erhöht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein rekombinantes DNA-Molekül, das die R11-DNA enthält.

Die R11-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung können, vorzugsweise in rekombinanter Form als Plasmide, direkt oder als Bestandteil eines rekombinanten Virus, oder Bakteriums verabreicht werden. Prinzipiell kann jede gentherapeutische Methode für die Immuntherapie von Krebs auf Basis von DNA ("DNA-Vakzine") auf R11-DNA angewendet werden, und zwar sowohl *in vivo* als auch *ex vivo*.

Beispiele für die *in vivo* Verabreichung sind die direkte Injektion von "nackter" DNA, entweder intramuskulär oder mittels Gen-Pistole ("gene gun") von der sich gezeigt hat, daß sie zur Bildung von CTLs gegen Tumorantigene führt. Beispiele für rekombinante Organismen sind Vaccinia Virus, Adenovirus oder *Listeria monocytogenes* (eine Übersicht wurde von Coulie, 1997, gegeben). Desweiteren können synthetische Träger für Nukleinsäuren, wie kationische Lipide, Mikrosphären, Mikrokügelchen oder Liposomen für die *in vivo* Verabreichung von Nukleinsäure-Molekülen, kodierend für R11-Peptid verwendet werden. Ähnlich wie für Peptide können verschiedene Hilfsstoffe, die die Immunantwort verstärken, mitverabreicht werden, z.B. Zytokine, entweder in Form von Proteinen oder dafür kodierenden Plasmiden. Die Applikation kann gegebenenfalls mit physikalischen Methoden, z.B. Elektroporation, kombiniert werden.

Ein Beispiel für die ex vivo Verabreichung ist die Transfektion dendritischer Zellen, wie von Tuting, 1997, beschrieben, oder anderer APCs, die als zelluläre Krebsvakzine zur Anwendung kommen.

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt die Verwendung von Zellen, die R11 exprimieren, entweder von sich aus oder, in gegebenenfalls modifizierter Form, nach Transfektion mit der entsprechend kodierenden Sequenz, für die
- 10 Herstellung einer Krebsvakzine.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Antikörper gegen R11 bzw. Fragmente davon. Polyklonale Antikörper können in herkömmlicher Weise durch Immunisierung von Tieren, insbesondere Kaninchen,

15 mittels Injektion des Antigens bzw. Fragmenten davon, und anschließender Reinigung des Immunglobulins erhalten werden.

Monoklonale anti-R11-Antikörper können nach Standardprotokollen gemäß dem von Köhler und Milstein,

20 1975, beschriebenen Prinzip gewonnen werden, indem Tiere, insbesondere Mäuse, immunisiert, anschließend antikörperproduzierende Zellen der immunisierten Tiere immortalisiert werden, z.B. durch Fusion mit Myelomzellen, und der Überstand der erhaltenen

25 Hybridome mittels immunologischer Standard-Assays auf monoklonale anti-R11-Antikörper gescreent wird. Für den therapeutischen oder diagnostischen Einsatz im Menschen können diese tierischen Antikörper gegebenenfalls auf herkömmliche Weise chimierisiert (Neuberger et al.,

1984, Boulianne et al., 1984) oder humanisiert
(Riechmann et al., 1988, Graziano et al., 1995) werden.

Humane monoklonale anti-R11-Antikörper(fragmente)
können auch von sog. „Phage Display Libraries“ (Winter
5 et al., 1994, Griffiths et al., 1994, Kruif et al.,
1995, Mc Guinness et al., 1996) und mittels transgener
Tiere (Brüggemann et al., 1996, Jakobovits et al.,
1995) gewonnen werden.

Die erfindungsgemäßen anti-R11-Antikörper können in
10 immunhistochemischen Analysen für diagnostische Zwecke
eingesetzt werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die
Verwendung von R11-spezifischen Antikörpern, um
beliebige Substanzen selektiv zu bzw. in einen Tumor zu
15 bringen, der R11 exprimiert. Beispiele für solche
Substanzen sind zytotoxische Agentien oder radioaktive
Nuklide, deren Wirkung darin besteht, den Tumor vorort
zu schädigen. Aufgrund der tumorspezifischen Expression
von R11 sind dabei keine oder nur geringe

20 Nebenwirkungen zu erwarten. In einem weiteren Aspekt
können mit Hilfe von R11-Antikörpern Substanzen zur
Sichtbarmachung von Tumoren, die R11 exprimieren,
herangezogen werden. Dies ist für die Diagnose und die
Bewertung des Therapieverlaufs von Nutzen.

25 Therapeutische und diagnostische Anwendungen von
Antikörpern, die für anti-R11-Antikörper in Frage
kommen, sind in der WO 95/33771 beschrieben.

Das TAA der Bezeichnung R11 gemäß der vorliegenden
Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente,
30 Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika

können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z. B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von R11-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Mamma-, Nierenzell- und Pankreaskarzinom.

Figurenübersicht

- Fig. 1: Transkription von R11 in Tumor- und Normalgeweben: Semiquantitative RT-PCR
- Fig. 2: Transkription von R11 in Tumorgewebe und Normalgewebe: Qualitative PCR
- Fig. 3: Northern Blot Analyse von R11 in Normalgeweben
- Fig. 4: Transkription von R11: Qualitative RT-PCR aus RNA von humanen Tumorzelllinien
- Fig. 5: Modifizierte Region des pCR3.1(+)-Vektors.

Beispiel 1:

Zellkultur der von einem humanen Pankreaskarzinom abgeleiteten Zelllinie MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 und Isolierung der poly A⁺ RNA

- Die Zelllinie MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 ist von einem humanen Pankreaskarzinom (MZ.PC2) abgeleitet; sie wurde wie folgt erhalten: Zunächst wurden die Tumorzellen einmal

in der Maus passagiert und ein Klon für weitere Studien ausgewählt (MZ.PC 2m7#1). Dieser Klon wurde unter Standardbedingungen (Ausubel et al., 1994) mit einem eukaryontischen Vektor (pEF-BOS; Promotor stammt vom humanen EF-1alpha Gen, Selektionsmarker: Puromycin; Mizushima und Nagata, 1990), der die cDNA des humanen B7.1 Gens (Selvakumar et al., 1992) enthält, transfektiert. Ein Klon MZ-PC2 m7#1 B7.1#3 wurde ausgewählt und in T150 Zellkulturflaschen

10 hochgezüchtet. Als Nährmedium diente RPMI 1640 (Gibco plus 4g/L Glukose) mit 10% hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin. Alle 3 bis 4 Tage wurden die Zellen durch Trypsinisieren 1:5 zur Propagation gespalten. Nach Erreichen von etwa

15 80% Konfluenz wurden pro T150 Zellkulturflasche 4 ml einer Trypsinlösung (Angaben pro Liter: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,13g Na₂HPO₄-wasserfrei, 0,2g KH₂PO₄, 100ml 2,5% Trypsinlösung, 1g EDTA-Na-Salz; pH7,2-7,4) zum Ernten der Zellen eingesetzt. Insgesamt wurden 2x10⁷

20 Zellen zur Isolierung der RNA nach dem Protokoll des Herstellers (RNeasy Minikit, QIAgen) eingesetzt. Ausgehend von ca. 100 µg total-RNA wurde für die Isolierung von polyA⁺ RNA mittels des Oligotex Kit (QIAgen) entsprechend dem Hersteller-Protokoll

25 vergangen. Im Anschluß daran wurde ausgehend von ca. 0,5 mg polyA⁺ RNA die cDNA Synthese nach Angaben des Herstellers (Clontech Marathon Protokoll) durchgeführt.

Beispiel 2:

30 Repräsentative Differenzanalyse („Representational Difference Analysis“; RDA) der

Pankreaskarzinomzelllinie MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 versus
einem Pool von 11 Normalgeweben

- Ausgehend von ca. 0,5 µg poly-A(+) der
Pankreastumorzelllinie MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 und einem
5 Pool aus 2,5 µg poly-A(+) RNA von 11 Normalgeweben
(Clontech) Knochenmark, Herz, Niere, Leber, Lunge,
Pankreas, Skelettmuskel, Milz, Thymus, Dünndarm und
Magen wurde die RDA-Studie (Diatchenko et al., ; Hubank
and Schatz,) unter Verwendung des PCR-select™ Kit
10 (Clontech, Palo Alto) entsprechend dem Hersteller-
Protokoll durchgeführt: dabei wurde die RNA der
Pankreastumorzelllinie als „tester“, die des
Normalgewebepools als „driver“ entsprechend dem
Hersteller-Protokoll eingesetzt. Im Gegensatz zum
15 ursprünglichen Protokoll wurde nach der Synthese von
doppelsträngiger cDNA mittels oligo-dT die cDNA mit
6 Restriktionsenzymen: *EcoRV*, *NaeI*, *NruI*, *ScaI*
(Promega), *SspI*, *StuI* (TaKaRa) in Promega Puffer A 2
Stunden bei 37°C und nach Erhöhung der NaCl
20 Konzentration auf 150 mM weitere 2 Stunden bei 37°C
geschnitten. Der Einsatz dieser Mischung von
6 verschiedenen Restriktionsenzymen erlaubte die
Generierung von ca. 800 bp langen cDNA-Fragmenten, die
zur Repräsentativen Differenzanalyse zum Einsatz kamen.
- 25 Gleiche Teile von „tester-cDNA“ wurden entweder mit den
Adaptoren A oder B ligiert und anschließend getrennt
mit einem Überschuß an „driver-cDNA“ bei 68°C
hybridisiert. Danach wurden die beiden Ansätze
vereinigt und einer zweiten Hybridisierung mit frischer
30 denaturierter „driver-cDNA“ unterworfen. Die
angereicherten „tester“-spezifischen cDNAs wurden

- anschließend durch PCR mit für die Adaptoren A bzw. B spezifischen Primern des Kits mit 2 Minuten Elongationszeit bei 72°C exponentiell amplifiziert, 27 Zyklen (10'' 94°C, 30'' 66°C, 2' 72°C). Für eine
- 5 weitere Anreicherung wurde ein Aliquot dieser Reaktion einer zweiten PCR mit spezifischen nach innen versetzten („nested“) Primern des Kits mit 2 Minuten Elongationszeit bei 72°C unterworfen, 10 Zyklen (10'' 94°C, 30'' 66°C, 2' 72°C). Das aus dieser
- 10 Reaktion resultierende Produkt wurde in 3 verschiedene eigens modifizierte pCR3.1(+)-Vektoren (Invitrogen): Vektor (1.ORF), Vektor (2.ORF) und Vektor (3.ORF) (Fig. 5: CMV Cytomegalovirus; BGH Bovine Growth Hormone; ORF Open Reading Frame)
- 15 ligiert und anschließend in kompetente *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) transformiert. Diese Vektoren ermöglichen die Expression in eukaryontischen Zellen in 3 unterschiedlichen Leserahmen.
- Für die Konstruktion der 3 Vektoren wurde der
- 20 pCR3.1(+)-Vektor (Invitrogen) mit NheI und HindIII (Promega) geschnitten und mit jeweils einem dsDNA Oligomer, das durch das Annealen von jeweils zwei ssDNA Oligomeren (SEQ ID NO:3 und 4; Vektor ORF1) oder (SEQ ID NO:5 und 6; Vektor ORF2) oder (SEQ ID NO:7 und 8;
- 25 Vektor ORF3) hergestellt wurde, nach Standardprotokollen ligiert (z.B. Ausubel et al., 1994; Sambrook et al. 1989). Die 3 Vektortypen besitzen ein Startcodon und eine Klonierungsstelle für die Expression in einem jeweils von den anderen beiden
- 30 Vektoren unterschiedlichen Leserahmen.

Die in drei Ansätzen (Vektor 1.ORF, 2.ORF und 3.ORF) durchgeführte Transformation von kompetenten *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) mit der cDNA der subtraktiven cDNA-Bibliothek ergab etwa 9600 Klone. Diese wurden
5 mittels PCR Analyse auf die Präsenz und Länge der Insert cDNA überprüft. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: die 9600 Klone wurden in 96-Napf Blöcken in LB-Amp Medium für 48 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden 5 µl Aliquots der *E. coli*
10 Suspensionen in 500 µl TE Puffer für 10 Minuten auf 100°C erhitzt und 1,5 µl davon als Vorlage für eine PCR verwendet, bei der das Insert des Vektors mit flankierenden Primern (SEQ ID NO:9 und 10) amplifiziert wurde , 35 Zyklen (1' 94°C, 1' 55°C, 2' 72°C). Die
15 PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Die verbleibenden Bakterienkulturen wurden als Glycerinstammkulturen bei -80°C gelagert.

Dadurch wurde eine cDNA-Subtraktionsbibliothek aus
20 3450 Einzelklonen erhalten, die als *E. coli* Glycerin-Stammkulturen vorlagen und deren Insertlänge durch die Agarose-Gel-Elektrophorese bekannt war. Dabei konnte, wie erwartet, eine mittlere Länge der inserierten cDNA-Fragmente von ca. 800 bp nachgewiesen werden.

25

Beispiel 3:

DNA-Sequenzierung und Annotation von Klonen der subtraktiven cDNA-Bibliothek der Pankreastumorzelllinie MZ.PC2 m7#1 B7.1#3

Die Plasmid-DNA von 50 aus der subtraktiven cDNA-Bibliothek willkürlich ausgewählten Klonen wurde entsprechend den Herstellerangaben (QIAGEN) isoliert und nach der Sanger-Methode auf einem ABI-Prism Gerät
5 sequenziert. Die so ermittelten Sequenzen wurden mittels BLAST-Search (National Center for Biotechnology Information) annotiert und EST-Datenbankvergleichen unterzogen. Das erlaubte die Identifizierung von 38 bekannten und 12 unbekannten Genen. Für letztere
10 existierten lediglich EST-Einträge. Für die 12 unbekannten Gene wurde eine Abschätzung des Expressionsprofils vorgenommen: dabei wurde für alle in Datenbanken ESTs mit > 95% Identität (BLAST) zur experimentell ermittelten Sequenz das Ausgangsgewebe
15 für die entsprechende cDNA-Bibliothek überprüft. Es wurde eine Unterteilung in i) kritische Normalgewebe, ii) foetale, „verzichtbare“ und immunprivilegierte Gewebe und iii) Tumore und Tumorzelllinien vorgenommen. Auf der Basis dieses „virtuellen mRNA-Profiles“ wurden 4
20 Klone (R2, R8, R11 und R12) für eine weitere experimentelle Analyse ausgewählt.

Beispiel 4:

Transkriptionelle Analyse der Kandidaten-Klone in
25 Tumor- und Normalgewebe

Zwischen 2 und 5 µg total-RNA aus Tumor- oder Normalgeweben wurden mittels SuperScriptII (GibcoBRL) oder AMV-RT (Promega) entsprechend den Herstellerempfehlungen revers transkribiert. Für jede
30 individuelle RNA Probe wurde ein zweiter Ansatz ohne

reverse Transkriptase als Kontrolle für Kontamination durch chromosomale DNA durchgeführt. Qualität und Menge der cDNAs wurde durch PCR mit β -Actin spezifischen Primern (SEQ ID NO:13 und 14) und GAPDH spezifischen Primern (SEQ ID NO:15 und 16) nach 30 und 35 Zyklen (1' 95°C, 1' 55°C, 1' 72°C), überprüft. Die 4 Kandidatengene wurden analog mit jeweils spezifischen Primern analysiert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Dabei zeigte ein Kandidat, der mit „R11“ bezeichnet wurde, nach 35 Zyklen mit R11-spezifischen Primern (SEQ ID NO:11 und 12) ein relativ spezifisches Tumor/Testis-Transkriptionsprofil; die semiquantitative RT-PCR von RNA aus Mammakarzinom, Lungen-Adenokarzinom, Lungen-Plattenepithelkarzinom, Nierenkarzinom, Kolonkarzinom, Herz, Lunge, Leber, Niere, Kolon, Milz und Testis ist in Fig. 1 dargestellt. Eine weitere qualitative PCR von cDNA aus Patientengewebe von 3 humanen Pankreastumoren mit denselben R11-spezifischen Primern (SEQ ID NO:11 und 12) zeigte die Expression in humanen Pankreastumoren (Fig. 2). Weiters wurde eine zusätzliche qualitative PCR von cDNA aus verschiedenen Tumorzelllinien von humanen Lungen- (LC 6, 16), Gallenblase- (GB 1) und Pankreastumoren (PC 1, 2) sowie zwei Melanomen (Mel 2, 7) mit denselben R11-spezifischen Primern (SEQ ID NO:11 und 12) durchgeführt, die eine deutliche Expression in allen Tumorzelllinien (Fig. 4) zu erkennen gab. Bei dieser Analyse wurde nach dem Protokoll von Perkin Elmer (GeneAmp RNA PCR Kit, #N808-0017) vorgegangen (RT-Reaktion: (1x) 15'/42°C - 5'/99°C - 5'/4°C; PCR-Reaktion: (35x) 2'/95°C - 1'/95°C - 1'/60°C und (1x)

77/72°C - 4°C (Fig. 4). Wie oben beschrieben, wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Als Größenmarker kam ein 1kb Größenmarker von Gibco BRL zum Einsatz.

5

Beispiel 5:

Transkriptionsprofil von R11 in Normalgeweben

Für die Northern Blot Analyse wurden „Human Multiple Tissue Northern Blots“ (Clontech, Palo Alto und Invitrogen) mit dem [α -³²P]dCTP (NEN, Boston) markierten etwa 1000 bp langen R11 PCR Produkt bei 68° für 2 h hybridisiert. Die Visualisierung erfolgte durch Standard-Autoradiografie (Hyperfilm, Amersham). Fig. 3 zeigt das Ergebnis dieser Analyse: von 19 Normalgeweben (Pankreas, Nebennierenmark, Schilddrüse, Nebennierenrinde, Testis, Thymus, Dünndarm, Magen, Hirn, Herz, Skelettmuskel, Kolon, Milz, Niere, Leber, Plazenta, Lunge, Leukozyten). Für R11 zeigt sich in Plazenta, Nebennierenmark, Nebennierenrinde und in Testis ein prominentes Transkript von 7,5 kb Länge. Eine sehr schwache Bande von 7,5 kb kann auch im Hirn nachgewiesen werden. Da alle diese Normalgewebe einen immunprivilegierten Status aufweisen (Streilein, 1995), ist bei einer auf diesem Antigen beruhenden Immuntherapie eine Attacke durch CTL auszuschließen.

Weitere Transkripte von 3,8 kb und 2,3 kb, welche möglicherweise Spleißvarianten des 7,5 kb Transkripts darstellen oder von einem homologen Gen abgeleitet

sind, wurden im Nebennierenmark und der Nebennierenrinde identifiziert (Fig. 3).

Beispiel 6:

5 Klonierung der cDNA von R11

Zur Klonierung der humanen R11-cDNA wurde wie folgt vorgegangen: eine BLAST-Analyse ergab, daß zu der in Beispiel 3 durch Sequenzierung erhaltenen R11 „Originalsequenz“ (796 bp) ein überlappendes Fragment AF038197 und eine Vielzahl von überlappenden ESTs, wie z.B. N42343, W69539, H82474, H51766, N28313, identifiziert werden konnten. Ausgehend von der Sequenz AF038197 wurde mit dem EstExtractor auf TigemNet (<http://gcg.tigem.it/cgi-bin/uniestass.pl>) ein mit dem Klon R11 überlappendes Contig gefunden. Die Überlappung des Contigs und der 796 bp R11 „Originalsequenz“ konnte durch PCR-Amplifikation mit einem R11 „Originalsequenz“ spezifischen Primer und einem am Contig liegenden Primer (SEQ ID NO:17 und 18) aus einer SuperScript™ Human Testis cDNA Library (GibcoBRL) und anschließender Sequenzierung verifiziert werden. Aus der SuperScript™ Human Testis cDNA Library konnten durch eine PCR mit einem R11 spezifischen Primer (SEQ ID NO: 19) und einem Vektor-spezifischen Primer (SEQ ID NO: 20) weitere zu R11 gehörende Fragmente unter Verwendung des Advantage cDNA PCR Kit (Clontech) und dem dort beschriebenen Standardprotokoll amplifiziert werden. Die Kenntnis dieser neuen Sequenzen ermöglichte wiederum PCR Ansätze mit R11 spezifischen Primern (SEQ ID NO: 21 und 22) und dem Vektor-spezifischen Primer (SEQ ID NO: 20).

Für die weiter Verlängerung der R11-cDNA wurde ein humane Testis Rapid-Screening cDNA Library panel (OriGene Technologies, Inc) mit für R11 spezifischen Primern (SEQ ID NO: 23 und 24) unter den vom Hersteller angegebenen Standard PCR-Bedingungen gescreent. Von den positiven Nüpfchen wurde ein Aliquot als Template für eine PCR mit einem R11 spezifischen und einem für den Vektor spezifischen Primer (SEQ ID NO: 25 und 26) unter Verwendung des Advantage cDNA PCR Kit (Clontech) und dem dort beschriebenen Standardprotokoll amplifiziert.

Für die Sequenzanalyse wurden Aliquote der PCR-Ansätze direkt in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen) ligiert und anschließend in kompetente *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) transformiert und, wie in Beispiel 3 beschrieben, sequenziert.

Der klonierte Bereich der R11-cDNA beträgt 5714 bp wobei das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes am 3'-Ende der Sequenz für die Vollständigkeit der cDNA in diesem Bereich spricht. Ein durchgehender Leserahmen ist durch das Startkodon an Position 570 und das Stopkodon (TAA) an Position 1638 repräsentiert. Da zu diesem Gen keine Datenbankeintragungen von bekannten Genen existieren, kann über die Funktion keine Aussage getroffen werden. Eine Analyse des Proteinprofils (<http://www.expasy.ch/prosite/>) ergab neben den zwei offensichtlichen Prolin-reichen Abschnitten (Position # 128-141 und 330-351 in SEQ ID NO: 2), potentielle Motive für zwei N-Glykosylierungsstellen (104-107 und 250-253), eine Protein Kinase C Phosphorylierungsstelle (108-110), vier Casein Kinase II Phosphorylierungsstellen (99-102, 165-168, 198-201,

273-276), zwei N-Myristoylierungsstellen (21-26, 309-314) und eine Region mit Ähnlichkeit zum aktiven Zentrum von eukaryontischen und viralen Aspartat Proteinasen (16-27).

5

Beispiel 7:

Potentielle MHC-Bindungspeptide in der für den C-terminalen Teil von R11 kodierenden Region

Potentielle Peptid-Epitope innerhalb der kodierenden
10 Region des C-terminalen Fragmentes von R11 gemäß
(SEQ ID NO: 2) wurden mittels den von Parker et. al.,
1994 beschriebenen Algorithmen unter Zugrundelegung
bekannter Motive (Rammensee et al. 1995) durchgeführt.
Für die wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1,
15 -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, wurden 9-mer
Kandidaten-Peptide identifiziert, von denen zu erwarten
ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden
und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die
ermittelten Peptide sind in Tab. 1 aufgelistet. Durch
20 analoges Vorgehen können weitere potentielle Peptid-
Epitope für andere HLA-Typen bzw. 8- und 10-mer Peptide
ermittelt werden.

Tabelle 1

25 Immunogene Peptid-Kandidaten des C-terminalen
Fragmentes von R11 (356 Aminosäuren)

05.05.00

42

| Start-position in SEQ ID NO: 2 | Sequenz | HLA |
|--------------------------------------|------------|--------------------------------|
| 1 | MLQIHLPGR | HLA-A3 |
| 4 | IHLPGRHTL | HLA-A*0201, HLA-B14 |
| 5 | HLPGRHTLF | HLA-A3 |
| 31 | YVAQNGIPL | HLA-B7 |
| 39 | LRIKDWPIIL | HLA-B14 |
| 46 | ILVEAIDGR | HLA-A3 |
| 53 | GRPIASGPV | HLA-B14 |
| 64 | ETHDLIVDL | HLA-B14 |
| 71 | DLGDHREVL | HLA-A*0201, HLA-B7, HLA-B14 |
| 73 | GDHREVLSE | HLA-B*4403 |
| 85 | QSPFFPVVL | HLA-B7 |
| 92 | VLGPRWLSA | HLA-A*0201 |
| 97 | WLSAHPNI | HLA-A*0201 |
| 110 | RSIVFDSEY | HLA-B*4403 |
| 112 | IVFDSEYCR | HLA-A3 |
| 134 | PPPAPQPPL | HLA-B7 |
| 141 | PLYYPVDGY | HLA-A3 |

05.05.00

43

| | | |
|-----|------------|---------------------|
| 150 | RVYQPVRYYY | HLA-A3 |
| 152 | YQPVRYYYV | HLA-A*0201 |
| 155 | VRYYYYVQNV | HLA-B14 |
| 159 | YVQNVYTPV | HLA-A*0201 |
| 169 | EHVYPDHRL | HLA-B14 |
| 177 | LVDPHIEMI | HLA-A*0201, HLA-A1 |
| 183 | EMIPGAHSI | HLA-A*0201 |
| 189 | HSIPSGHVY | HLA-A1, HLA-B*4403 |
| 191 | IPSGHVYSL | HLA-B7, HLA-A*0201 |
| 198 | SLSEPEMAA | HLA-A*0201 |
| 199 | LSEPEMAAL | HLA-A1 |
| 202 | PEMAALRDF | HLA-B*4403 |
| 203 | EMAALRDFV | HLA-A*0201 |
| 206 | ALRDFVARN | HLA-A*0201 |
| 211 | VARNVKDGL | HLA-B7 |
| 223 | TIAPNGAQV | HLA-A*0201 |
| 224 | IAPNGAQVL | HLA-B7 |
| 231 | VLQVKRGWK | HLA-A3 |
| 232 | LQVKRGWKL | HLA-A*0201, HLA-B14 |
| 257 | YPRLSIPNL | HLA*7 |

05.05.00

| | | |
|-----|-----------|--------------------|
| 266 | EDQAHLATY | HLA-B*4403 |
| 270 | HLATYTEFV | HLA-A*0201 |
| 306 | GRDGQGRSL | HLA-B14 |
| 307 | RDGQGRSLY | HLA-B*4403 |
| 308 | DGQGRSLYV | HLA-B14 |
| 313 | SLYVPVMIT | HLA-A*0201, HLA-A3 |
| 320 | ITWNPHWYR | HLA-A3 |

Literatur

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D.,
5 Smith, J.A., Seidman, J.G., Struhl, K. (Eds), (1994),
Vol. 1+2 „Current Protocols in Molecular Biology“, John
Wiley&Sons. Inc.
- Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga,
10 J., and Knop, J. (1997), J. Immunol. Methods 203,
171-180.
- Blake, J., Johnston, J.V., Hellström, K.E., Marquardt,
H., and, Chen, L. (1996), J. Exp. Med. 184, 121-130.
15
- Boon, T, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der
Bruggen, and A. Van Pel (1994), Annu.Rev.Immunol. 12:
337-365
- 20 Boon T , (1998), Tumor antigens recognized by cytolytic
T cells. Cancer Vaccine Week - Interantional Symposium,
New York, Oct 1998; abstract S01
- Boulianne, G. L., et al., (1984), Nature 312, 643-646
25
- Brüggemann, M. und Neuberger, M.S., (1996), Immunol.
Today 17, 391-397
- Buschle M, Schmidt W, Zauner W, Mechtler K, Trska B,
30 Kirlappos H, Birnstiel M (1997), Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. 94, 3256-3261

Celluzzi, CM and Falo, LD, Jr. (1998), J. Immunol. 160, 3081-3085

Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure,
5 A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E.,
Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997), Proc. Natl.
Acad. Sci. U. S. A. 94, 1914-1918.

Coulie, P.G. (1997), Mol. Med. Today 3, 261-268

10

Cox, AL, Skipper, J, Chen, Y, Henderson, RA, Darrow,
TL, Shabanowitz, J, Engelhard, VH, Hunt, DF, and
Slingluff, CL, Jr. (1994), Science 264, 716-719

15 Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik,
A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K.,
Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. (1996),
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 6025-6030.

20 Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P.,
Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H.,
Pardoll, D., and Mulligan, R. (1993), Proc. Natl. Acad.
Sci. U. S. A 90, 3539-3543.

25 Elble, R., Widom, J., Gruber, A.D., Abdel-Ghany, M.,
Levine, R., Goodwin, A., Cheng, H.-C., and Pauli, B.U.
(1997), J. Biol. Chem. 272, 27853-27861.

Emini, EA, Hughes, J, Perlow, D, and Boger, J (1985),
30 J. Virol. 55, 836-839

Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G., and Rammensee, H-G (1991), Nature 351, 290-296.

5 Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P.,
Levitsky, H.I., Simons, J.W., Karasuyama, H.,
Vogelstein, B., and Frost, P. (1990), Cell 60, 397-403.

10 Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K.,
Bannerji, R., and Gilboa, E. (1990), J. Exp. Med. 172,
1217-1224.

Gaudi C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F (1999),
J Immunol 162:1730-1738

15 Graziano, R.F., et al., (1995), J. Immunol. 155,
4996-5002

Griffiths, A.D., et al., (1994), EMBO J. 13, 3245-3260

20 Halliday, GM, Patel, A, Hunt, MJ, Tefany, FJ, and
Barnetson RS (1995), World J. Surg. 19, 352-358

Hogan KT, Eisinger DP, Cupp SBC, Lekstrom KJ, Deacon DD,
Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Slingluff CL, Ross
MM (1998), Cancer Res 58:5144-5150

25 Hubank, M. and Schatz, D.G., (1994), Nucleic. Acids.
Res. 22, 5640-5648.

30 Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J.,
Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H.,
Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J., and Knuth, A.
(1998), J. Exp. Med. 187, 265-270.

Jakobovits, A., (1995), Curr. Opin. Biotechnol. 6,
561-566

- 5 Jameson, BA and Wolf, H (1988), The antigenic index: a
novel algorithm for predicting antigenic determinants.
Comput. Appl. Biosci. 4, 181-186

- Jessup, JM and Loda, M (1998), Prognostic markers in
10 rectal carcinoma. Semin. Surg. Oncol. 15, 131-140.

- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K.,
King, X., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A.,
Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1995), J. Immunol.
15 154, 3961-3968.

Kawakami, Y, Robbins, PF, and Rosenberg, SA (1996),
Keio J. Med. 45, 100-108

- 20 Köhler, G. und Milstein, C. (1975), Nature 265, 495-497

Kruif, J., et al., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 92, 3938-3942

- 25 Kyte, J and Doolittle, RF (1982), J. Mol. Biol. 157,
105-132

- Lethe, B, Lucas, S, Michaux, L, De Smet, C, Godelaine,
D, Serrano, A, De Plaen, E, and Boon, T (1998), Int. J.
30 Cancer 76, 903-908

Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, Triebel F, Faure F, Viel S, and Hercend T (1993), Cancer Res. 53, 3569-3573

5 Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P (1997) , J Exp Med 186:785-793

Marchand M, Weynants P, Rankin E et al (1995), Int. J. Cancer 63:883-885

10 Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., DeLeo, A.B., and Lotze, M.T. (1995), Nature Medicine 1, 1297-1302.

15 McGuinness, B.T., et al., (1996), Nature Biotechnol. 14, 1149

Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM (1996), Curr. Opin. Immunol. 8, 651-657

20

Mizushima, S. and Nagata, S. (1990), Nucleic Acids Res. 18, 5322.

25 Murphy, G.P., Elgamal, A.A., Su, S.L., Bostwick, D.G., and Holmes, E.H. (1998), Cancer 83, 2259-2269

Neuberger, M.S., et al., (1984), Nature 312, 604-608

30

Pardoll, D. M. (1998), Nature Medicine 4, 525-531

Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. (1994), J. Immunol. 152, 163.

Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S.,
Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., and
Kawakami, Y. (1996), J. Immunol. 157, 2539-2548.

5

Paterson Y, Ikonomidis G (1996), Curr. Opin.
Immunol. 5, 664-669

Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995),
10 Immunogenetics 41, 178-228

Rapellino, M, Pecchio, F, Baldi, S, Scappaticci, E, and
Cavallo, A (1995), Anticancer Res. 15, 1065-1070

15 Ravaioli, A., Bagli, L., Zucchini, A., and Monti, F.
(1998), Cell. Prolif. 31, 113-126

Revillion, F, Bonnetterre, J, and Peyrat, JP (1998),
Eur. J. Cancer 34, 791-808

20

Restifo NP (1996), Curr. Opin. Immunol. 5, 658-63

Riechmann, L., et al., (1988), Nature 332: 323-327

25 Robbins, PF and Kawakami, Y (1996), Curr. Opin.
Immunol. 8, 628-636

Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey,
H.M., and Sette, A. (1993), Cell 74, 929-937.

30

Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B.,
Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G.,

Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 11810-11813

5 Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989

Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A, Riethmuller G, and Segurado OG (1993),
10 J. Immunol. 151, 4209-4220

Schmidt W, Buschle M, Zauner W, Kirlappos H, Mechtler K, Trska B, Birnstiel M (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94, 3262-3267

15 Schweighoffer, T. (1997), Onc. Res. 3, 164-176

Selvakumar, A., Mohanraj, B.K., Eddy, R.L., Shows, T.B., White, P.C., and Dupont, B. (1992) Immunogenetics
20 36, 175-181.

Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M.-F.,
25 Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., and Chisari, F.V. (1994), J. Immunol. 153, 5586-5592.

Stauss, H.J., Davies, H., Sadovnikova, E., Chain, B., Horowitz, N., and Sinclair, C. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89, 7871-7875.
30

Streilein, J.W. (1995), Science 270, 1158-1159.

Tepper, R.I., Pattengale, P.K., and Leder, P. (1989),
Cell 57, 503-512.

- 5 Tighe H, Corr, M, Roman M, and Raz E (1998), Immunol.
Today 19, 89-97

- Toes, R.E., Hoeben, R.C., Van der Voort, E., Rensing,
M.E., Van-der-Eb, A.J. Melief, C.J.M., and Offringa, R.
10 (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 14660-14665

Tuting, T., DeLeo, A.B., Lotze, M.T., and Storkus,
W.J., (1997), Eur. J. Immunol. 27, 2702-2707,.

- 15 Van den Eynde, B. and Brichard, V.G. (1995), Curr.
Opin. Immunol. 7, 674-681.

Van den Eynde, BJ, and van der Bruggen, P (1997), Curr.
Opin. Immunol. 9, 684-693

20

van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C.
Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and
T. Boon. (1991), Science 254, 1643-1647

- 25 van der Burg, S.H., et al., (1996), J. Immunol. 156,
3308-3314

- van Elsas, A., van der Minne, C.E., Borghi, M., van der
Spek, C.W., Braakman, E., Osanto, S., and Schrier, P.I.
30 (1996), CTL Recognition of an IL-2 Producing Melanoma
Vaccine. In: Immunology of human melanoma. Tumor-host

interaction and immunotherapy, edited by M. Maio,
Amsterdam: IOS, 1996, p. 165-173

5 van Elsas, A., Aarnoudse, C., van der Minne, C.E., van
der Spek, C.W., Brouwenstijn, N., Osanto, S., and
Schrier, P.I. (1997), J. Immunother. 20, 343-353.

Vaughan, T.J., et al., (1998), Nature Biotechnol. 16,
535-539

10

Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler,
KW (1995), Science 270, 484-487

Wang, L., et al., (1997), Mol. Immunol. 34, 609-618

15

Wang, RF (1997), Mol. Med. 3, 716-731

Winter, G., et al., (1994), Annu. Rev. Immunol. 12,
433-455

20

Wölfel T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH,
Rammensee, HG, Rotzschke, O, and Falk, K (1994), Int.
J. Cancer 57, 413-418

25

Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C,
Klehmman-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum
Büschchenfelde KH, Beach D (1995), Science 269:1281-1284

30

Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F.,
Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R.,
August, J.T., and Pardoll, D.M. (1995), Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S.A. 92, 11671-11675.

Zitvogel, L., Mayordomo, J.I., Tjandrawan, T., DeLeo, A.B., Clarke, M.R., Lotze, M.T., and Storkus, W.J. (1996), J. Exp. Med. 183, 87-97.

- 5 Zhu, D., Cheng., C.-F., and Pauli, B.U. (1992), J. Clin. Invest. 89, 1718-1724.

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Boehringer Ingelheim International GmbH
<120> Tumorassoziertes Antigen
<130> 12-111

10 <140>
<141>

<160> 70

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 5714
<212> DNA
20 <213> Homo sapiens

<220>
<221> 5'UTR
<222> (1)..(569)
25 <223> putativ

<220>
<221> CDS
<222> (570)..(1640)

30

<220>
<221> 3'UTR
<222> (1641)..(5714)

35 <400> 1
cttgagacct caagcgaagg ttgcaacgca agatcagagc tgcgcaaggc atggggtctg 60
tcatcgacta ctcaatgctt tccagatgat tgcccaggac ctggattgga acgagcctgc 120
40 gctgattgac cagtaccacg agggcctcag cgaccacatt caggaggagc tctcccacgt 180
cgaggtcgcc aagtcgctgt ctgctctgat tgggcagtgc attcacattg agagaaggct 240
ggccagggct gctgcagctc gcgagccaag ctgccacccc cgggcgctgg tgttgctca 300
45 cattgcaagc caccaccagg tagatcaacc gagcgggtgg gaggtgcccg catgcgcctg 360
acgcaggaag aaaaagaaag acgcagaaag ctgaacctgt gcctctactg tggaacagga 420
50 ggtcactacg ctgacaattg tcctgccaag gcctcaaagt ctgcgcggc gggaaactcc 480
ccggccccgc tgtagaggga ccttcagcga cggggccaga aataataagg tccccacaag 540

gaa cct gaa atg gca gct ctt cga gat ttt gtg gca aga aat gta aaa 1217
 Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe Val Ala Arg Asn Val Lys
 205 210 215

5 gat ggg cta att act cca acg att gca cct aat gga gcc caa gtt ctc 1265
 Asp Gly Leu Ile Thr Pro Thr Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu
 220 225 230

10 cag gtg aag agg ggg tgg aaa ctg caa gtt tct tat gat gcc gag tcc 1313
 Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys Leu Gln Val Ser Tyr Asp Ala Glu Ser
 235 240 245

15 aac aat ttt act atc cag aat cag tat cct cgc cta tct att cca aat 1361
 Asn Asn Phe Thr Ile Gln Asn Gln Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn
 250 255 260

20 tta gaa gac caa gca cac ctg gca acg tac act gaa ttc gta cct caa 1409
 Leu Glu Asp Gln Ala His Leu Ala Thr Tyr Thr Glu Phe Val Pro Gln
 265 270 275 280

ata cct gga tac caa aca tac ccc aca tat gcc gcg tgc cgg acc tac 1457
 Ile Pro Gly Tyr Gln Thr Tyr Pro Thr Tyr Ala Ala Cys Pro Thr Tyr
 285 290 295

25 cca gta gga ttc gcc tgg tac cca gtg gga cga gac gga caa gga aga 1505
 Pro Val Gly Phe Ala Trp Tyr Pro Val Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg
 300 305 310

30 tca cta tat gta cct gtg atg atc act tgg aat cca cac tgg tac cgc 1553
 Ser Leu Tyr Val Pro Val Met Ile Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg
 315 320 325

35 cag cct ccg gta cca cag tac ccg ccg cca cag ccg ccg cct cca cca 1601
 Gln Pro Pro Val Pro Gln Tyr Pro Pro Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro
 330 335 340

40 cca cca ccg ccg ccg cct cca tct tac agt acc ctg taa atacctgtca 1650
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser Tyr Ser Thr Leu
 345 350 355

tgtccttcag gatctctgcc ctcaaaattt attcctgttc agcttctcaa tcagtgactg 1710
 tgtgctaaat tttaggctac tgtatcttca ggccacctga ggcacatcct ctctgaaaag 1770

45 gctatggaag gttagggcca ctctggactg gcacacatcc taaagcacca aaagaccttc 1830
 aacattttct gagagcaaca gagtatttgc caataaatga tctctcattt ttccaccttg 1890

50 actgccaatc taactaaaat aattaataag ttactttcc agccagtcct ggaagtctgg 1950
 gttttacctg ccaaaacctc catcaccatc taaattatag gctgccaaat ttgctgttta 2010
 acatttacag agaagctgat acaaacgcag gaaatgctga tttctttatg gagggggaga 2070

cgaggaggag gaggacatga cttttcttgc ggtttcggta ccctcttttt aaatcactgg 2130
 5 aggactgagg ccttattaag gaagccaaaa ttatcgggtgc agtgtggaaa ggcttccgtg 2190
 atcctctcgc tgcaccctta gaaacttcac cgtcttcaaa ctccatttcc atggttctgt 2250
 taattctcaa ggagcagcaa ctcgactggg tctcccagga gcaggaaaaa cccttgtgac 2310
 10 atgaaacatc tcaggcctga aaagaaagtg ctctctcaga tggactcttg catgttaaga 2370
 ctatgtcttc acatcatggg gcaaatacaca tgtaccaat gactccgggt ttgacacwac 2430
 accttaccat catcatgcca tgatggcttc cacaaagcat taaacctggg aaccagagat 2490
 15 tactgggtggc tccagcgttg ttagatgttc atgaaatgtg accacctctc aatcaccttt 2550
 gagggctaaa gagtagcaca tcaaaaggac tcaaaaatcc cataccaac tcttaagaga 2610
 20 tttgtcctgg tacttcagaa agaattttca tgagtgttct taattggctg gaaaagcacc 2670
 agctgaogtt ttggaagaat ctatccatgt gtctgcctcc atatgcatct gggcatttca 2730
 tcttcagtcc cctcattaga ctgtagcatt aggatgtgtg gagagaggag aaatgattta 2790
 25 gcaccagat tcacactcct atgcctggaa gggggacatc tttgaagaag aggaattagg 2850
 gctgtggaca ctgtcttgag gatgtggact tccttagtga gctccacatt acttgatggg 2910
 30 aaccacttca aaaggatcag aatccacgta atgaaaaagg tccctctaga ggatggagct 2970
 gatgtgaagc tgccaatgga tgaaaagcct cagaaagcaa ctcaaaggac tcaaagcaac 3030
 ggacaacaca agagtgtgtc tcagcccagt gacacctctg atgtcccctg gaagctttgt 3090
 35 gctaacctgg gactgcctga cttcctttag cctgggtccct tgctactacc ttgaactgtt 3150
 ttatctaacc tctctttttc tgtttaatc tttgtactg ccattgaccc tgctgcagga 3210
 40 tttgtgtcat tttcctgcct ggttgctgag actccatttt gctgccacac acagagatgt 3270
 aagaggcagg ctttaattgc caaagcacag tttgagcagt agaaaacaac atggtgtata 3330
 tctcaaattg cctgacatga agaggagtct aacggtgaag tttcactttt catcagcatc 3390
 45 atctttcaca tgttcattat catccgctct tattcttgca tgtttaaaca cttaaaattt 3450
 ttagtataat ttttagtgtg ttttgaagtg gtgactaggc tttcaaaaac ttccattgaa 3510
 50 ttacaaagca ctatccagtt cttattgtta aactaagtaa aaatgataag taacatagtg 3570
 taaaatattc ctttactgtg aacttcttac aatgctgtga atgagaggct cctcagaact 3630

ggagcatttg tataataatt catcctgttc atcttcaatt ttaacatcat atataatttc 3690
aattctatca attgggcctt taaaaatcat ataaaaggat ataaaatttg aaaagagaaa 3750
5 cctaattggc tatttaatcc aaaacaactt ttttttctt tcaatggaat cagaaagctt 3810
gtcaatcact catgtgtttt agagtaatta cttttaaaat ggtgcatttg tgcttctgaa 3870
ctattttgaa gagtcacttc tgtttacctc aagtatcaat tcctctoca tacatttgaa 3930
10 ttcaagttgt tttttgtcaa atttacagtt gtcaattgat cttcaagctg caggggtgcct 3990
agaaatgggc cgttgtctgt agccctggca tgtgcacaog gacatttgcc accactgcaa 4050
15 gcaaaagtct ggagaagttc accaacgaca agaacgatta gggaaaatat gctgctgtgg 4110
gttaacaact cagaaagtcc ctgatccaca tttggctgtt tactaaagct tgtgattaac 4170
tttttggcag tgtgtactat gctctattgc tatatatgct atctataaat gtagatgtta 4230
20 aggataagta attctaaatt tattattcta tagttttgaa gtttggttaa gtttcctttc 4290
actcaattga tttattttgt tgtaaatcaa atttatgtta attggatcct ttaaattttt 4350
25 tttggcattt tccaacaaaa atggctttat tcataagaaa ggaaaaaat caatggaatt 4410
tgatatctaa agaagttaga aaggagcaa aataaaaaac ataaaggaga tagatgaatt 4470
agtaagcaaa tcagtagtcg agtttttcaa actggcaaaa ttaattaatt gacttttagc 4530
30 ccaaatttac attgttaatt aaatcaagaa ggaagaagat ctaagagctc ccattgatag 4590
gcaagcctag agagaactag ctaaatttat catgctagga tattgaaaca cagaaagttt 4650
35 acatacattt atgaagggc aatttagttt ggacagttag gtatttgtct tagtggaata 4710
aaggagaatt agtctgatca aatcgtgaag taatacagtg aacttgcagg tgcacaaaat 4770
aagagggcca catctatatg gtgcagtctg gaattctgtt taagtttgta ggtacctctt 4830
40 ggacttctga attgatccag ttgtcatcca ccacagacat ctacatcag atacagacag 4890
ttccaagatt gacaacagag aacaacctgc tggaaagacc tgggcagaaa tggagagccc 4950
45 tgcgggaacc atgctacatt ttcatctaaa gagagaatgc acatctgatg agactgaaag 5010
ttctttgttg ttttagattg tagaatggta ttgaattggt ctgtggaaaa ttgcattgct 5070
tttatttctt tgtgtaatca agtttaagta ataggggata tataatcata agcatttttag 5130
50 ggtgggaggg actattaagt aattttaagt ggggtggggtt atttagaatg ttagaataat 5190
attatgtatt agatatcgtc ataagtggac atgcgtactt acttgtaacc ctttacccta 5250

05.05.00

60

taattgctat ccttaaagat ttcaaataaa ctcgaggga actgcagga gaccaactta 5310
5 tttagagcga attggacatg gataaaaacc ccagtgggag aaagttcaaa ggtgattaga 5370
ttaataattt aatagaggat gagtgcctc tgataaatta ctgctagaat gaacttgtca 5430
atgatggatg gtaaattttc atggaagtta taaaagtgat aaataaaaac ccttgctttt 5490
10 acccctgtca gtagccctcc tctaccact gaacccatt gccctaccc ctcttctaa 5550
ctttattgct gtattctctt cactctatat ttctctctat ttgctaatat tgcattgctg 5610
ttacaataaa aattcaataa agatttagtg gttaagtgc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5670
15 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 5714

<210> 2
20 <211> 356
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
25 Met Leu Gln Ile His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu Phe Val Arg Ala
1 5 10 15
Met Ile Asp Ser Gly Ala Ser Gly Asn Phe Ile Asp His Glu Tyr Val
20 25 30
30 Ala Gln Asn Gly Ile Pro Leu Arg Ile Lys Asp Trp Pro Ile Leu Val
35 40 45
35 Glu Ala Ile Asp Gly Arg Pro Ile Ala Ser Gly Pro Val Val His Glu
50 55 60
Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu Gly Asp His Arg Glu Val Leu Ser
65 70 75 80
40 Phe Asp Val Thr Gln Ser Pro Phe Phe Pro Val Val Leu Gly Pro Arg
85 90 95
Trp Leu Ser Ala His Asp Pro Asn Ile Thr Trp Ser Thr Arg Ser Ile
100 105 110
45 Val Phe Asp Ser Glu Tyr Cys Arg His His Cys Arg Met Tyr Ser Pro
115 120 125
Ile Pro Pro Ser Leu Pro Pro Pro Ala Pro Gln Pro Pro Leu Tyr Tyr
50 130 135 140
Pro Val Asp Gly Tyr Arg Val Tyr Gln Pro Val Arg Tyr Tyr Tyr Val
145 150 155 160

05.05.00

61

Gln Asn Val Tyr Thr Pro Val Asp Glu His Val Tyr Pro Asp His Arg
165 170 175

5 Leu Val Asp Pro His Ile Glu Met Ile Pro Gly Ala His Ser Ile Pro
180 185 190

Ser Gly His Val Tyr Ser Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu Arg
195 200 205

10 Asp Phe Val Ala Arg Asn Val Lys Asp Gly Leu Ile Thr Pro Thr Ile
210 215 220

Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys Leu
15 225 230 235 240

Gln Val Ser Tyr Asp Ala Glu Ser Asn Asn Phe Thr Ile Gln Asn Gln
245 250 255

20 Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu Glu Asp Gln Ala His Leu Ala
260 265 270

Thr Tyr Thr Glu Phe Val Pro Gln Ile Pro Gly Tyr Gln Thr Tyr Pro
275 280 285

25 Thr Tyr Ala Ala Cys Pro Thr Tyr Pro Val Gly Phe Ala Trp Tyr Pro
290 295 300

Val Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr Val Pro Val Met Ile
30 305 310 315 320

Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Val Pro Gln Tyr Pro
325 330 335

35 Pro Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser
340 345 350

Tyr Ser Thr Leu
355

40

<210> 3
<211> 31
45 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
50 <222> (1)..(31)

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:synthetischer Primer

<400> 3
 ctagcccacc atggcatctg cagccaogtg a 31

5
 <210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

10
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)

15
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 4
 agcttcacgt ggctgcagat gccatggtgg 30

20
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

25
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)

30
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 5
 35 ctagcccacc atggcatctg cagcacgtga 30

<210> 6
 <211> 29
 40 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> primer_bind
 45 <222> (1)..(29)

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

50 <400> 6
 agcttcacgt ggtgcagatg ccatggtgg 29

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 5
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(29)
 10
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 <400> 7
 ctagcccacc atggcatctg cacacgtga 29
 15
 <210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 20
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(28)
 25
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 <400> 8
 30 agcttcacgt gtgcagatgc catggtgg 28
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 35
 <220>
 <221> primer_bind
 40 <222> (1)..(23)
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 45
 <400> 9
 gggcggtagg cgtgtacggt ggg 23
 50
 <210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

5 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 10
gcaactagaa ggcacagtcg aggctg 26

10

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
15 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(27)

20

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 11
25 gtttggacag tgaggtattt gtcttag 27

<210> 12
<211> 27
30 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
35 <222> (1)..(27)

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 12
40 ctttccagca ggttggtctc tgttgtc 27

<210> 13
45 <211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
50 <221> primer_bind
<222> (1)..(30)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 13

tgacggggtc acccacactg tgcccatcta

30

5

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(29)

15

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 14

20 ctagaagcat tgcggtggac gatggaggg

29

<210> 15

<211> 22

25 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

30 <222> (1)..(22)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

35 <400> 15

aaggtgaagg tcggagtcaa cg

22

<210> 16

40 <211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

45 <221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

50

<400> 16

ggcagagatg atgacccttt tggc

24

| | | |
|----|--|----|
| | <210> 17 | |
| | <211> 26 | |
| | <212> DNA | |
| 5 | <213> Künstliche Sequenz | |
| | <220> | |
| | <221> primer_bind | |
| | <222> (1)..(26) | |
| 10 | <220> | |
| | <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer | |
| | <400> 17 | |
| 15 | tattttgctc cctttctaac ttcttt | 26 |
| | <210> 18 | |
| | <211> 30 | |
| 20 | <212> DNA | |
| | <213> Künstliche Sequenz | |
| | <220> | |
| | <221> primer_bind | |
| 25 | <222> (1)..(30) | |
| | <220> | |
| | <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer | |
| 30 | <400> 18 | |
| | tttcactttt catcagcatc atctttcaca | 30 |
| | <210> 19 | |
| 35 | <211> 27 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Künstliche Sequenz | |
| | <220> | |
| 40 | <221> primer_bind | |
| | <222> (1)..(27) | |
| | <220> | |
| 45 | <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer | |
| | <400> 19 | |
| | cgttagactc ctcttcatgt caggcaa | 27 |
| 50 | <210> 20 | |
| | <211> 22 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Künstliche Sequenz | |

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(22)
 5
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 <400> 20
 10 ggtgacacta tagaaggtac gc 22
 <210> 21
 <211> 28
 15 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <221> primer_bind
 20 <222> (1)..(28)
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 25 <400> 21
 caggcctgag atgtttcatg tcacaagg 28
 <210> 22
 30 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 35 <221> primer_bind
 <222> (1)..(29)
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 40 <400> 22
 gcatttcctg cgtttgtatc agcttctct 29
 <210> 23
 45 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 50 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 23

5 accagcacca caacogccac tctattatcc

30

<210> 24

<211> 30

10 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer bind

15 <222> (1)..(30)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

20 <400> 24

catatagtga tcttccttgt cagtctogtc

30

<210> 25

25 <211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

30 <221> primer bind

<222> (1)..(26)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

35

<400> 25

gcgccatca attgcttcca caagta

26

40 <210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

45 <220>

<221> primer bind

<222> (1)..(21)

<220>

50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 26

gcagagctcg tttagtgaac c

21

<210> 27
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Met Leu Gln Ile His Leu Pro Gly Arg
10 1 5

<210> 28
15 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
20 Ile His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu
1 5

<210> 29
25 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
30 His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu Phe
1 5

<210> 30
35 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
40 Tyr Val Ala Gln Asn Gly Ile Pro Leu
1 5

45

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
50 <213> Homo sapiens

<400> 31
Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu

05.05.00

70

1 5

5 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 32
Ile Leu Val Glu Ala Ile Asp Gly Arg
1 5

15 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 33
Gly Arg Pro Ile Ala Ser Gly Pro Val
1 5

25 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens

<400> 34
Glu Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu
1 5

35 <210> 35
<211> 9
40 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Asp Leu Gly Asp His Arg Glu Val Leu
45 1 5

<210> 36
50 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

05.05.00

71

<400> 36
Gly Asp His Arg Glu Val Leu Ser Phe
1 5

5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Ser Pro Phe Phe Pro Val Val Leu
1 5

15

<210> 38

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

25 Val Leu Gly Pro Arg Trp Leu Ser Ala
1 5

<210> 39

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

35 Trp Leu Ser Ala His Asp Pro Asn Ile
1 5

40 <210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 <400> 40

Arg Ser Ile Val Phe Asp Ser Glu Tyr
1 5

50

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

05.05.00

72

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ile Val Phe Asp Ser Glu Tyr Cys Arg

5 1 5

<210> 42

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

15 Pro Pro Pro Ala Pro Gln Pro Pro Leu

1 5

<210> 43

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

25 Pro Leu Tyr Tyr Pro Val Asp Gly Tyr

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

35 Arg Val Tyr Gln Pro Val Arg Tyr Tyr

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<400> 45

Tyr Gln Pro Val Arg Tyr Tyr Tyr Val

1 5

50

<210> 46

```
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

5 <400> 46
Val Arg Tyr Tyr Tyr Val Gln Asn Val
 1 5

10

| | |
|-------|--------------|
| <210> | 47 |
| <211> | 9 |
| <212> | PRT |
| <213> | Homo sapiens |

15 <400> 47
Tyr Val Gln Asn Val Tyr Thr Pro Val
 1 5

```

20      <210> 48
        <211> 9
        <212> PRT
25      <213> Homo sapiens

        <400> 48
        Glu His Val Tyr Pro Asp His Arg Leu
          1                               5

```

```

30
    <210> 49
    <211> 9
35    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 49
    Leu Val Asp Pro His Ile Glu Met Ile
40      1                      5

```

```

45      <210> 50
        <211> 9
        <212> PRT
        <213> Homo sapiens

        <400> 50
50      Glu Met Ile Pro Gly Ala His Ser Ile
         1                               5

```

08-08-00

74

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 51
His Ser Ile Pro Ser Gly His Val Tyr
1 5
10

<210> 52
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Ile Pro Ser Gly His Val Tyr Ser Leu
20 1 5

<210> 53
25 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
30 Ser Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala
1 5

<210> 54
35 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
40 Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu
1 5

<210> 55
45 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
50 Pro Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe
1 5

75

<210> 56
5 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
10 Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe Val
 1 5

<210> 57
15 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
20 Ala Leu Arg Asp Phe Val Ala Arg Asn
 1 5

<210> 58
25 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
30 Val Ala Arg Asn Val Lys Asp Gly Leu
 1 5

<210> 59
35 <211> 9
<212> PRT
40 <213> Homo sapiens

<400> 59
Thr Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val
 1 5

<210> 60
45 <211> 9
<212> PRT
50 <213> Homo sapiens

<400> 60

05.05.00

76

Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu
1 5

5
<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10
<400> 61
Val Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys
1 5

15
<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20
<400> 62
Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys Leu
1 5

25
<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30
<400> 63
Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu
1 5

35
<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40
<400> 64
Glu Asp Gln Ala His Leu Ala Thr Tyr
1 5

45
<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50
<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

08.08.00

77

5 <400> 65
His Leu Ala Thr Tyr Thr Glu Phe Val
 1 5

10 <210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 66
Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu
 1 5

20 <210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 67
Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr
 1 5

30 <210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 68
Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr Val
 1 5

40 <210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 69
Ser Leu Tyr Val Pro Val Met Ile Thr
 1 5

50 <210> 70
 <211> 9

08.08.00

78

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

5 Ile Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg
1 5

Patentansprüche

1. Tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung R11,
5 dadurch gekennzeichnet, daß es die in SEQ ID NO: 2 definierte Aminosäuresequenz aufweist oder diese als Teilsequenz enthält.
2. Immunogenes Proteinfragment oder Peptid, dadurch
10 gekennzeichnet, daß es von dem in Anspruch 1 definierten tumorassoziierten Antigen abgeleitet ist.
3. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 2, das eine humorale Immunantwort auslöst.
4. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 2, das bzw.
15 dessen Abbauprodukte durch MHC-Moleküle präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen.
5. Immunogenes Peptid nach Anspruch 4, ausgewählt aus der Gruppe von Peptiden gemäß SEQ ID NO:27 bis 70.
- 20 6. Immunogenes (Poly)peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für die Immuntherapie von Krebserkrankungen *in vivo* oder *ex vivo*, wobei das (Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen des Patienten induziert, die R11 exprimieren.
- 25 7. Pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, topische, orale oder lokale Verabreichung, dadurch gekennzeichnet, daß sie als

wirksame Komponente ein oder mehrere immunogene (Poly)peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.

- 5 8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie verschiedene, von R11 abgeleitete immunogene Peptide enthält.
- 10 9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein oder mehrere von R11 abgeleitete Peptide in Mischung mit von anderen tumorassoziierten Antigenen abgeleiteten Peptiden enthält.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, daß die Peptide an mindestens zwei verschiedene HLA-Typen binden.
- 15 11. Isoliertes DNA-Molekül, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften des in Anspruch 1 definierten tumorassoziierten Antigens oder für Fragmente davon.
- 20 12. DNA-Molekül nach Anspruch 11, kodierend für ein immunogenes Polypeptid der Bezeichnung R11, das die in SEQ ID NO: 2 enthaltene Aminosäuresequenz aufweist oder diese enthält, bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide.
- 25 13. DNA-Molekül nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz ist oder diese Sequenz enthält oder daß es ein Polynukleotid ist oder dieses enthält, das mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO: 1

dargestellten Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

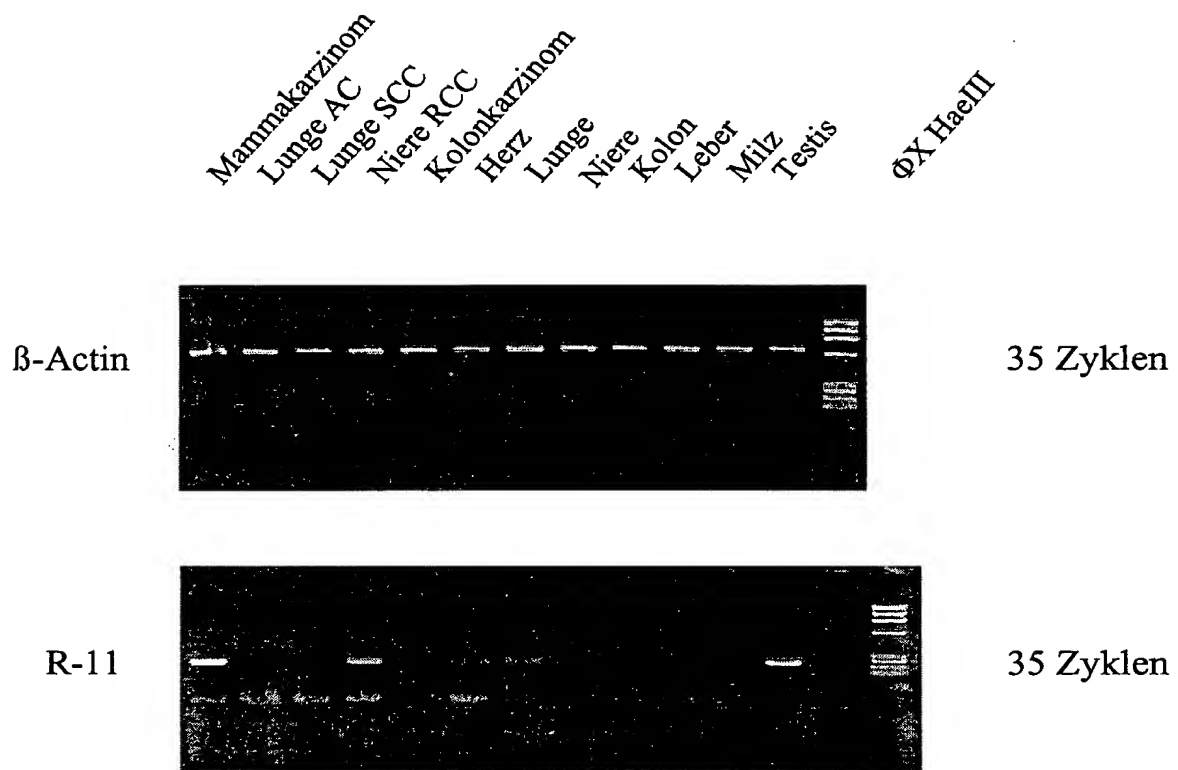
14. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
- 5 15. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 11 bis 14, für die Immuntherapie von Krebserkrankungen, wobei das von dem DNA-Molekül exprimierte R11 (Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen des Patienten induziert, die R11 exprimieren.
- 10 16. Verwendung von Zellen, die das in Anspruch 1 definierte Antigen exprimieren, für die Herstellung einer Krebsvakzine.
17. Antikörper gegen ein in einem der Ansprüche 1 bis 5 definiertes (Poly)peptid.
- 15 18. Antikörper nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
19. Antikörper nach Anspruch 17 oder 18 für die Therapie und Diagnose von Krebserkrankungen, die mit der Expression von R11 assoziiert sind.

Zusammenfassung

- 5 Tumorassoziiertes Antigen, davon abgeleitete immunogene Peptide und dafür kodierende kodierende DNA-Moleküle sowie deren Verwendung in der Immuntherapie von Krebserkrankungen.

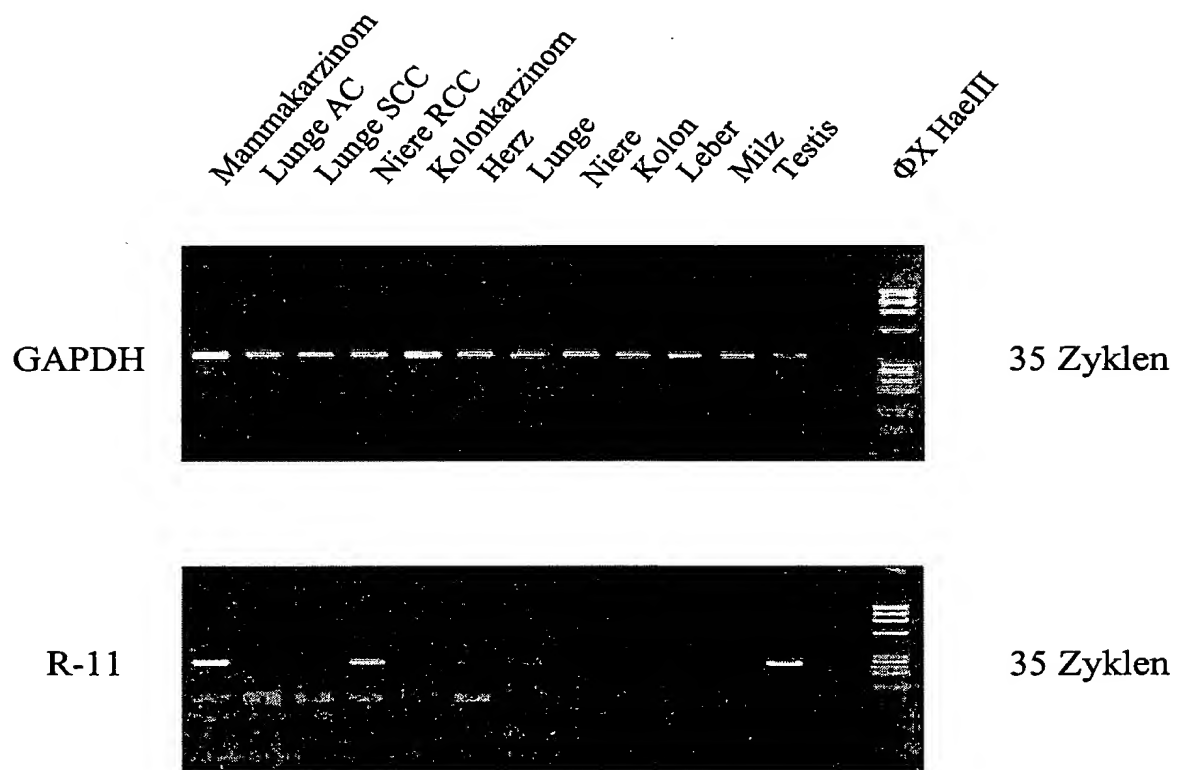
08.06.00

Fig. 1A



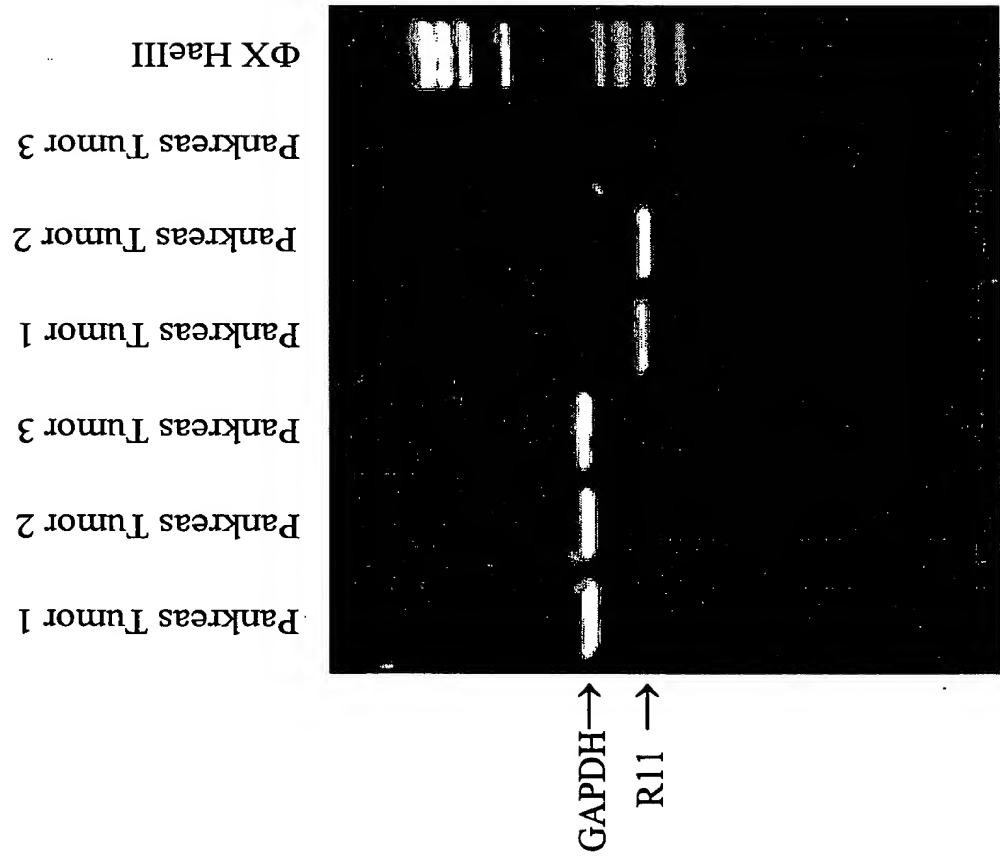
06.06.00

Fig. 1B



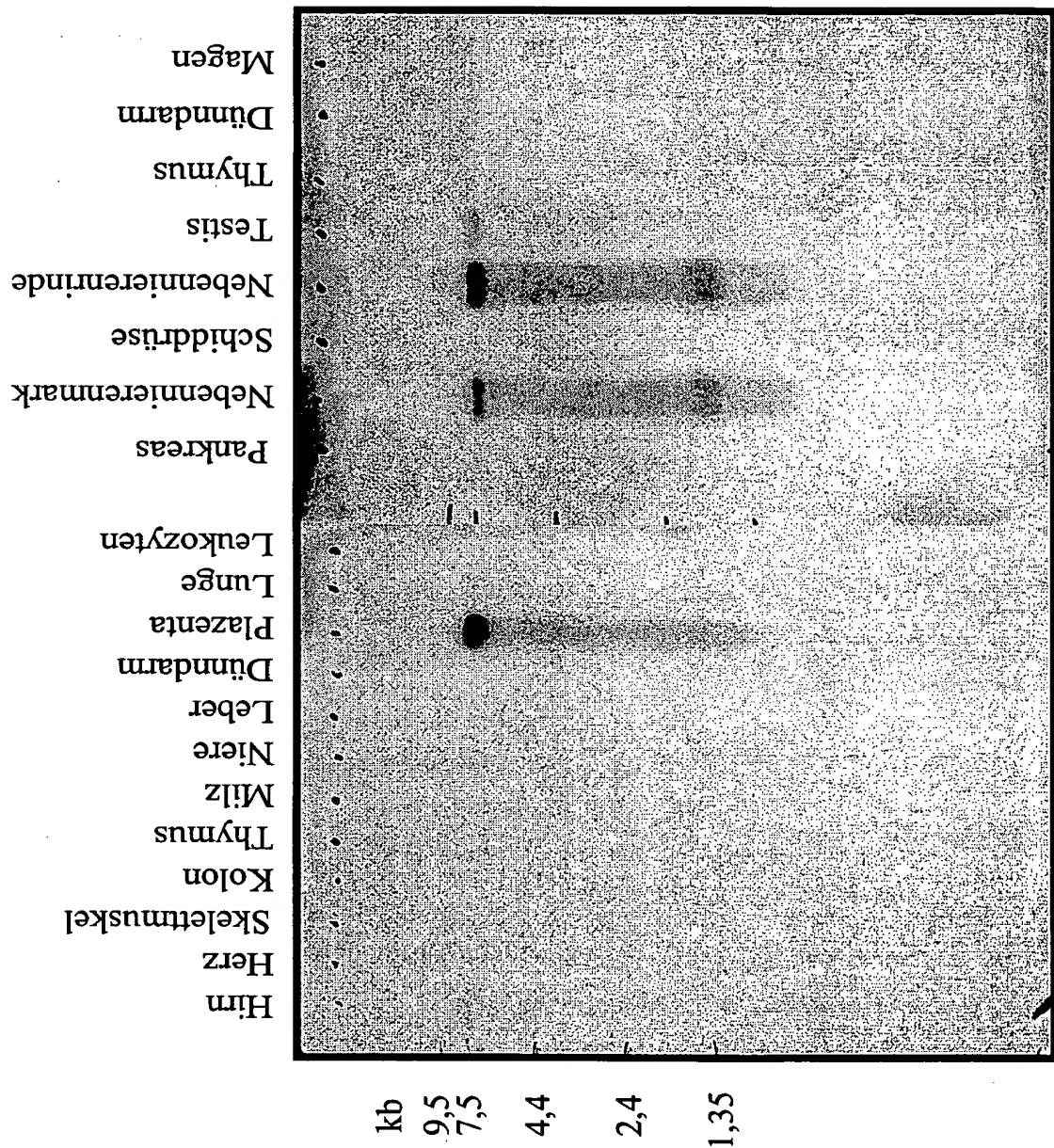
05.05.00

Fig. 2



06.06.00

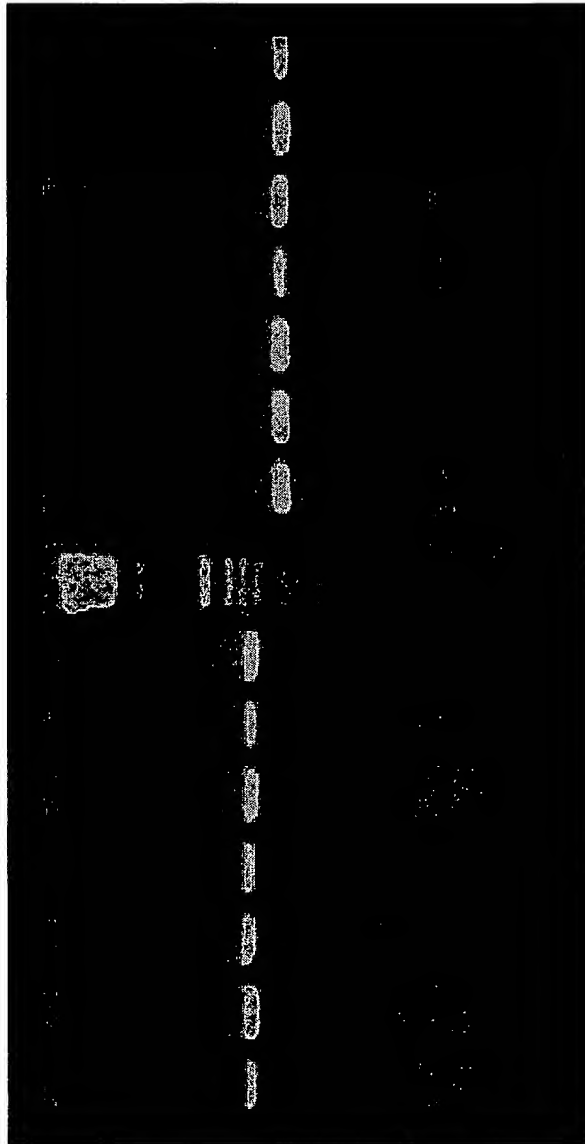
Fig. 3



06.06.00

Fig. 4

LC 6
LC 16
GB 1
Mei 2
Mei 7
PC 1
PC 2
Marker
LC 6
LC 16
GB 1
Mei 2
Mei 7
PC 1
PC 2



(35 Zyklen)

08.08.00

Fig. 5

